N°d'enregistrement
au C.N.R.S. : A09332

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Solange de **LAUZON**

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FONCTIONS OVARIENNE ET PLACENTAIRE CHEZ LES MAMMIFERES A L'AIDE DE MICROMETHODES D'ANALYSE SPECIFIQUE

soutenue le 15 DEC. 1973 devant la Commission d'Examen

MM. SOULAIRAC Président

OZON Examinateurs

JAYLE

N°d'enregistrement
au C.N.R.S. : A09332

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Solange de **LAUZON**

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FONCTIONS OVARIENNE ET PLACENTAIRE CHEZ LES MAMMIFERES A L'AIDE DE MICROMETHODES D'ANALYSE SPECIFIQUE

soutenue le 15 DEC. 1973 devant la Commission d'Examen

MM. SOULAIRAC Président
OZON Examinateurs
JAYLE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT-PROPOS

Je ne peux présenter ce travail sans le dédier auparavant à Monsieur le Professeur Jayle. En acceptant de me compter au nombre des chercheurs de son laboratoire, il a pris en charge ma formation scientifique, m'a fait partager son enthousiasme et son expérience, m'a permis de profiter de l'étendue de ses connaissances. Au milieu des incessantes préoccupations qui chaque jour assaillent tout directeur de laboratoire important, Monsieur le Professeur Jayle m'a constamment témoigné une grande bienveillance et un intérêt soutenu. J'espère ne pas avoir déçu sa confiance, et les remerciements que je lui adresse ici ne peuvent être qu'un médiocre témoignage de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Soulairac a bien voulu présider le Jury de ma thèse : je lui adresse mes plus vifs remerciements ainsi qu'à Monsieur le Professeur Ozon qui a accepté la charge de Rapporteur.

Je veux assurer de ma sincère reconnaissance le Docteur Dray qui m'a fait partager son expérience en immunologie et dont l'intérêt pour cette partie de mon travail m'a été précieux. Je remercie également le Docteur Rombauts de sa collaboration sans laquelle cette étude immunologique n'aurait pu être réalisée.

Je n'oublie pas tous mes amis qui soit à la Fondation de Recherche en Hormonologie, soit surtout à la Faculté de Médecine, m'ont entourée de leur sympathie. Leur nombre est si grand qu'il m'est impossible de remercier ici chacun personnellement. Je mentionnerai tout particulièrement l'équipe avec laquelle j'ai travaillé et sans l'aide de laquelle je n'aurais jamais pu réaliser un tel travail. Nicole Cittanova qui est à la tête de cette équipe depuis un an m'a apporté une aide stimulante inestimable.

Dans le Service de Biochimie, nombreux sont ceux qui ont participé activement à la réalisation de cette thèse, soit par leur collaboration technique, soit par leur collaboration intellectuelle, soit encore par leur contribution personnelle en tant que cobayes humains.

Jacqueline Bourlier a assuré le travail long et fastidieux de dactylographie.

Vis-à-vis de chacun, je me sens une lourde dette de reconnaissance et je voudrais que tous sachent l'intensité de ma gratitude et de mon amitié.

INTRODUCTION

La mesure des taux des hormones stéroïdes dans le sang circulant ou dans les vaisseaux efférents des tissus sécréteurs permet de se faire une assez bonne idée de la physiologie de ces stéroïdes, le dosage des stéroïdes hormonaux dans les urines ne donnant qu'un reflet de leur métabolisme. Les taux des stéroïdes circulants donnent en effet des informations sur l'activité sécrétrice des organes producteurs et permettent de suivre plus directement l'évolution de cette activité lorsqu'on effectue une stimulation de l'une ou l'autre des fonctions hormonales. Cependant, les concentrations sanguines des stéroïdes ne sont qu'un reflet instantané d'une fonction car elles sont à chaque instant la résultante d'un équilibre entre la sécrétion de ces hormones et leur métabolisme intermédiaire.

Connaissant ainsi les limites d'une étude hormonale basée uniquement sur la détermination des taux de stéroïdes, mais connaissant également la contribution importante que peut représenter cette dernière lors de l'étude d'une fonction endocrinienne, nous cherchons, par notre travail, à exploiter, à l'aide de méthodes d'analyses ultrasensibles, le maximum de renseignements d'ordre physiologique fournis par la mesure des taux des estrogènes et des progestagènes.

Dans la première partie, nous étudions les spectres d'absorption et de fluorescence d'une trentaine de stéroïdes phénoliques et de leurs dérivés en milieu sulfurique et phosphorique. Les spectres des chromophores de Kober extraits selon le procédé d'Ittrich, en présence de paranitrophénol, par des solvants halogénés font également l'objet d'une étude systématique. Nous discutons l'intérêt des critères physicochimiques provenant de cette étude pour la caractérisation des estrogènes. Nous comparons ensuite les différentes techniques spectrométriques pour l'évaluation des trois principaux estrogènes et nous utilisons celle qui est la plus spécifique pour la détermination de ces stéroïdes dans l'ensemble des fractions libres et conjuguées du plasma sanguin humain.

Les méthodes précédemment étudiées n'ont pas une sensibilité suffisante pour évaluer les hormones estrogènes de la fraction libre du plasma sanguin, qui représentent les véritables principes actifs.

Parmi les méthodes de chromatographie gazeuse à capture d'électrons, de double dilution isotopique et de radiocompétition, ce sont les dernières qui permettent les meilleures performances. Nos recherches portent sur la synthèse d'antigènes couplant des dérivés des estrogènes à la cristalbumine de boeuf BSA. Ces antigènes sont administrés à des lapines et à des brebis. Avec les immunsérums obtenus, nous étudions les qualités essentielles requises pour leur utilisation dans un but analytique, en insistant plus particulièrement sur les notions d'affinité, de sensibilité et de spécificité des immunsérums. Nous faisons également une étude critique de deux techniques différentes de radiocompétition : l'une, utilisant une protéine spécifique comme agent de liaison est spécialement reliée à l'analyse de la progestérone; l'autre, basée sur la liaison antigène-anticorps, concerne uniquement la détermination des estrogènes. Ces recherches, essentiellement immunochimiques, constituent la deuxième partie de notre travail.

Dans la troisième partie, nous étudions dans différentes circonstances physiologiques de la femme, les estrogènes et la progestérone présents dans les fractions libres du plasma et de l'urine. Ainsi les ovaires seront stimulés par divers protocoles utilisant les gonadotrophines ménopausales HMG ou les gonadotrophines chorioniques HCG. Une étude de la progestérone et des estrogènes sera faite également au cours de la grossesse humaine; cette investigation, à la fois spécifique et très fine, devrait nous permettre de mieux comprendre les différents évènements qui caractérisent les stades successifs de la grossesse humaine.

Notre effort, dans cette dernière partie, porte également sur la production des estrogènes et de la progestérone chez la ratte et la présence de ces stéroïdes dans les différents fluides biologiques de cet animal, notamment au cours de la gestation, afin d'apporter quelques informations supplémentaires sur l'origine de ces hormones stéroïdes chez les mammifères.

PREMIERE PARTIE

ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES STEROIDES PHENOLIQUES PAR SPECTROPHOTOMETRIE ET FLUOROMETRIE

Le noyau phénolique des estrogènes confère à ce groupe de stéroïdes des propriétés caractéristiques. Une de celles-ci est le pouvoir d'absorption et de fluorescence dans l'ultra-violet à l'état naturel (DUGGAN et col., 1957). Par ailleurs, chauffés en milieu acide, les estrogènes donnent des composés colorés qui absorbent la lumière et sont fluorescents dans le visible; cette dernière propriété est partagée par de nombreux autres stéroïdes, mais la zone de fréquences concernées est très différente de celle des stéroïdes qui ne possèdent pas le noyau aromatique.

De nombreux auteurs ont étudié les conditions optimales d'absorption et de fluorescence au cours des réactions avec différents acides pour l'estrone, l'estradiol et l'estriol et ont ainsi pu mettre au point des techniques de dosage de ces trois phénolstéroïdes (JAILER, 1947 - FRIEDGOOD et GARST, 1948 - UMBERGER et CURTIS, 1949 - FINKELSTEIN, 1952, SLAUNWHITE et col., 1953 - LONGCHAMPT, 1958 ...). Peu d'auteurs, par contre, se sont intéressés aux différences éventuelles entre les spectres de ces trois stéroïdes et ceux de leurs dérivés très proches qui ont pu être identifiés dans un milieu biologique, ou qui sont susceptibles de l'être. Les quelques études qui ont été faites dans cette voie (HIRSHMAN, 1952 - AXELROD, 1953 - GOLDZIEHER, 1953, GIVNER et col., 1960 ...) ont mis en évidence des relations entre la structure de certains dérivés et les caractéristiques de l'un ou l'autre de ces spectres.

Nous avons tenté pour notre part d'apporter notre contribution à cette étude par l'examen systématique des spectres d'absorption et de fluorescence d'un grand nombre de phénolstéroïdes et de leurs dérivés après les avoir traités par un acide sous différentes conditions.

Par ailleurs, nous avons utilisé l'aspect analytique de la fluorométrie pour la détermination de l'ensemble des fractions libres et conjuguées de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol dans le plasma humain. Cette première partie comportera donc d'une part l'étude spectrophoto- et fluoro-métrique des estrogènes et de leurs principaux dérivés, d'autre part l'application de la technique fluorométrique à la détermination des estrogènes dans les milieux biologiques.

CHAPITRE I

ETUDE SPECTROPHOTOMETRIQUE

A) - MATERIEL

Nous nous référons à l'article publié en 1970 (de AUZON,1970).

B) - METHODES

Les différentes réactions acides pratiquées ont également été décrites dans l'article cité ci-dessus.

C) - DEFINITION DES SPECTRES ET DES GRANDEURS ENVISAGEES

1) Spectre d'absorption

Un chromophore est une molécule ou un groupement qui présente un arrangement électronique (double liaison d'une fonction cétone, d'un noyau benzénique, d'une molécule de naphtalène, etc...) tel qu'il permet une transition lorsque ces électrons sont excités par une lumière d'une fréquence définie. Ce phénomène de transition électronique correspond à une absorption de quanta d'énergie lumineuse. Pour une molécule complexe, la répartition statistique de cette absorption lumineuse constitue le spectre d'absorption.

Les stéroïdes, qui souvent possèdent soit des liaisons conjuguées soit des noyaux phénoliques, présentent ces caractéristiques spectrales. Celles-ci sont spécifiques pour une structure électronique définie. On peut donc caractériser un stéroïde par la longueur d'onde du maximum d'absorption et l'intensité d'absorption à ce maximum. Les longueurs d'onde caractéristiques sont notées en nanomètres (1 nm = 10^{-9} m). Les stéroïdes, ainsi que la plupart des chromophores, obéissent à la loi de Lambert-Beer qui peut se formuler ainsi :

$$D.O. = \log \frac{I_o}{I} = A = a_M bc$$

où : D.O. = densité optique = A = absorbance
I_o = intensité de la lumière avant passage à travers la solution
I = intensité de la lumière après passage à travers la solution
a_M = absorptivité moléculaire
b = épaisseur de la cuve contenant la solution analysée
c = concentration de la substance en mole/litre

La substitution ou la suppression de certaines fonctions chimiques dans la molécule d'un phénolstéroïde peut entraîner des modifications dans les longueurs d'onde caractéristiques et dans l'intensité des bandes d'absorption :

- un déplacement vers les courtes longueurs d'onde est appelé : hypsochromique
- un déplacement vers les grandes longueurs d'onde est appelé : bathochromique
- un accroissement dans l'intensité est appelé : un effet hyperchromique
- un affaiblissement dans l'intensité est appelé : un effet hypochromique

2) Spectre de fluorescence

Le retour à l'état fondamental des électrons excités par une lumière d'une fréquence définie peut s'accompagner de l'émission d'une lumière dont la longueur d'onde est toujours supérieure à celle de la longueur d'onde d'excitation. Cette lumière réémise s'appelle lumière de fluorescence. On l'observe généralement dans une direction perpendiculaire à la lumière d'émission. Pour une longueur d'onde d'excitation fixée, le spectre de fluorescence représente la distribution de l'intensité de la lumière émise en fonction de la longueur d'onde. L'intensité de la fluorescence dépend à la fois de la nature de la substance étudiée, de la longueur d'onde de la lumière incidente et de la concentration de la substance en solution.

3) Spectre d'excitation

Si la longueur d'onde de fluorescence est connue, il est possible d'étudier la répartition en fonction de la longueur d'onde, des chromophores excités responsables de cette fluorescence.

On trace ainsi un spectre d'excitation de fluorescence. La longueur d'onde du maximum du spectre d'excitation correspond à la longueur d'onde qui permet d'obtenir le spectre d'émission de fluorescence le plus intense.

Il existe entre les lumières d'excitation et de fluorescence (λ_E et λ_F) une lumière parasite de diffusion λ_D (figure 1).

4) Comportement chimique des composés au cours des réactions

Au cours de notre étude, nous avons noté les caractéristiques des colorations obtenues pour chacun des composés au cours des différentes réactions acides : la nature, la vitesse d'apparition, la transformation au cours du temps de ces colorations pouvant éventuellement contribuer à l'identification de l'un des dérivés.

5) Etude quantitative

Nous avons vu que l'intensité d'absorption de la lumière est proportionnelle à la concentration de la substance

$$D.O. = a_M bc.$$

Lorsque l'épaisseur de la couche traversée par le rayonnement lumineux est constante, la densité optique pour une substance donnée ne varie plus qu'avec la concentration des molécules absorbantes. D'où la possibilité de dosage de la substance.

De même, l'intensité de la fluorescence est fonction de la concentration de la substance. Dans le cas d'une étude quantitative, on a intérêt à choisir les conditions optimales pour obtenir un pic fluorescent haut et bien différencié, c'est-à-dire :

- la longueur d'onde d'excitation doit correspondre à la longueur d'onde maximale d'excitation du composé étudié.
- le système optique doit être très sélectif : monochromateurs, fentes, source possèdant la zone de longueurs d'onde adéquate ainsi qu'une forte intensité.

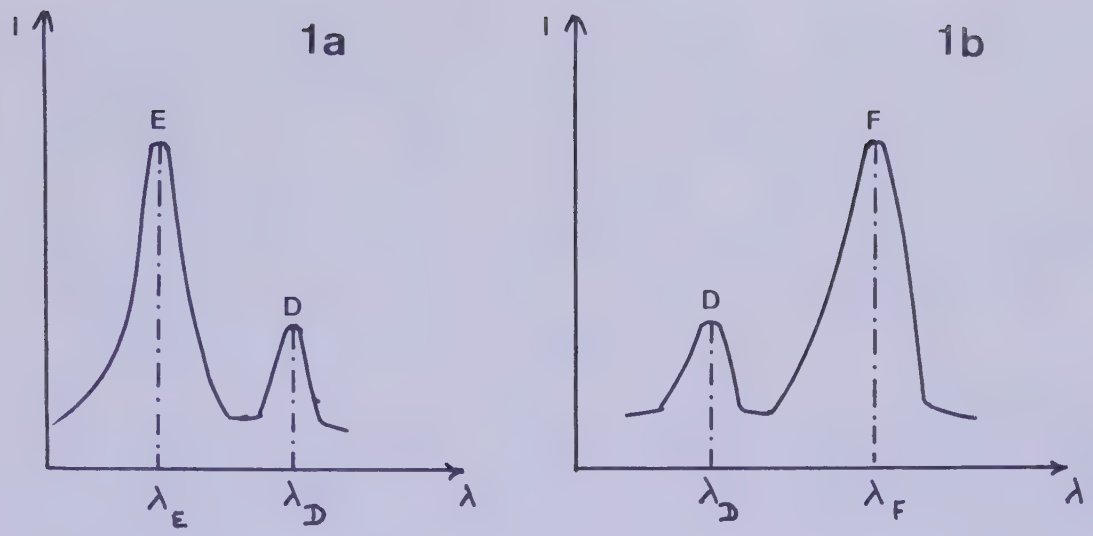


Fig. 1 - Schéma général d'un spectre
a) d'excitation
b) de fluorescence.

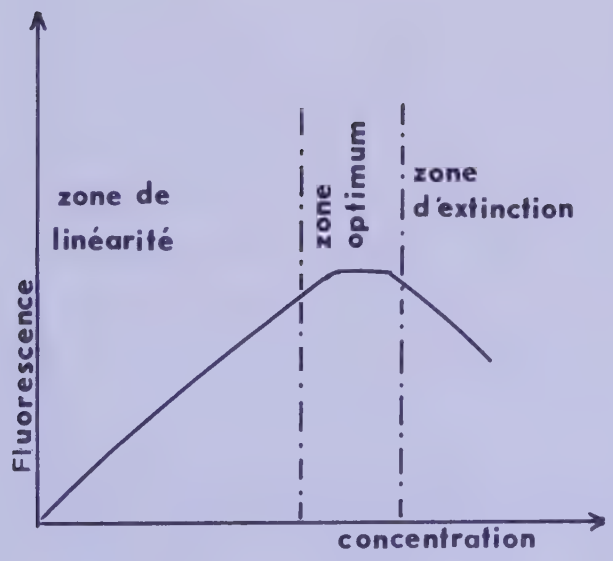


Fig. 2 - Intensité de la fluorescence en fonction de la concentration.

Ces différents facteurs étant choisis pour une fluorescence maximale, la concentration joue un rôle variable sur la fluorescence : pour des concentrations faibles, la courbe peut être assimilée à une droite et on a donc une relation linéaire entre l'intensité de la fluorescence et la concentration. Ceci n'est plus vrai pour des concentrations plus fortes où, après un court plateau au maximum de fluorescence, cette dernière présente une zone d'extinction progressive (figure 2).

La fluorescence peut être perturbée par le phénomène de quenching, c'est-à-dire l'affaiblissement de la lumière émise soit par auto-absorption (la lumière émise est absorbée par la solution elle-même avant d'atteindre les parois de la cuve qui la contient; ceci est fréquent lorsque le milieu est très coloré par des substances parasites), soit par transfert d'activation des molécules excitées sur des molécules étrangères non fluorescentes. Cette diminution du rendement de fluorescence peut être corrigée par la technique de l'étalon interne que nous décrirons plus loin.

D) - RESULTATS

Les tableaux I, II et III présentent les longueurs d'onde caractéristiques pour chaque dérivé de tous les spectres étudiés ainsi que les densités optiques des maximums d'absorption. Le tableau IV donne les rapports de l'absorptivité moléculaire des différents estrogènes comparée à celle de l'estrone après les réactions de Kober et d'Ittrich. Les dérivés phénoliques ont été classés d'après leur analogie structurale. Les spectres de chaque dérivé ont été décrits dans l'article cité plus haut (de LAUZON,1970). Nous décrirons seulement ici un schéma général du comportement des stéroïdes au cours de chaque réaction , ce schéma étant celui de l'estrone considérée ici comme le phénolstéroïde de base. Nous mentionnerons ensuite les dérivés se différenciant nettement de ce schéma général.

TABLEAU I

SPECTRES DANS L'ACIDE PHOSPHORIQUE

Composé	Absorption		Excitation	Fluorescence
	$\lambda_{max.}$ (D.O.)	$\lambda_{min.}$ (D.O.)		
Estrone	458(1,76) 510(0,15)E	350(0,14)°	460	480
Estradiol	459(0,54) 515(0,07)E	-	460	485
Estradiol-17α	458(1,04) 510(0,18)E	335	460	480
Estradiol-16α			460	480
Estradiol-16β			460	480
Estriol	450(0,67) 510(0,18)E	365(0,36)	460	490
16-Epi-estriol	458(0,35) 510(0,18)E	365(0,1)°	460	490
17-Epi-estriol	458(0,27) 510(0,18)E	375(0,1)°	460	485
16,17-Epi-estriol	313(0,1)° 451(1,2) 510(0,1)E	335(0,06)	460	485
16α-Hydroxy-estrone	483(0,45) 508(0,45)	495(0,44)	465°	530°
16β-Hydroxy-estrone	493(0,45)	-	465°	520°
7α-Hydroxy-estrone	460(0,52)	-	465	495

TABLEAU I (Suite)

Composé	Absorption		Excitation	Fluorescence
	λ max (D.O.)	λmin (D.O.)		
6-Oxo-estrone	302(0,15)E	-	420	470
6-Oxo-estradiol	302(0,32)	365(0,1)	420	470
16-Oxo-estrone	-	-	470°	510°
16-Oxo-estradiol	493	-	465 480 490	540
Estrone-16			430°	480°
17-Desoxo-estrone			465	490
2-Methoxy-estrone	410(0,15)E 480(0,26)	365(0,1)	415	470
2-Methoxy-estradiol	407(0,16) 495(0,45)	363(0,08)° 433(0,13)	415	470
2-Methoxy-estrone, 3-Me*	405(0,19) 490(0,4)	350(0,07) 421(0,15)	420	470

TABLEAU I (Suite)

Composé	Absorption		Excitation	Fluorescence
	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)		
Estrone, 3-Me	464 (0,99) 513 (0,13)E	345 (0,05)°	465	500
Estradiol, 3-Me	463 (0,84) 515 (0,07)E	-	465	500
Estradiol-17α, 3-Me	463 (0,92) 510 (0,14)E	340 (0,05)°	465	490
16α-Hydroxy-estrone, 3-Me			510	540
16-Oxo-estradiol, 3-Me	496 (0,49)	-	400	455
Estradiol-16β, 3-Me			470	490
Estriol, 3-Me			430	480
16-Epi-estriol, 3-Me			470	490
17-Epi-estriol, 3-Me	302 (0,13) 470 (0,2)° 505 (0,19)°	385 (0,07)	465	495
16,17-Epi-estriol, 3-Me			465	490
Estrone-16, 3-Me			470	530
Estrone, 3-E**			465	495
16α-Hydroxy-estrone, 3-E			400	458
Estriol, 3-E			465	510
16-Epi-estriol, 3-E			465	500

N.B. λ = Longueur d'onde
E = Épaulement ou inflexion
° = Maximum ou minimum peu net
D.O. = Densité optique
* = 3-méthyl-ether
** = 3-éthyl-ether

TABLEAU II

SPECTRES DANS L'ACIDE SULFURIQUE

Composé	10 minutes - 100°C				2 heures - 25°C	
	Absorption		Excitation	Fluorescence	Absorption	
	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)	λ max	λ max	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)
Estrone	300 (0,71) 449 (0,24)	250 (0,1) 370 (0,02)°	450	480	300 (0,55) 448 (0,32)	250 (0,07) 370 (0,03)°
Estradiol	300 (0,38)° 425 (0,86) 445 (0,3) E	251 (0,25)° 355 (0,12)	450	480	368 (0,37) 425 (0,68) 449 (0,46)	251 (0,08) 322 (0,1) 413 (0,21) E
Estradiol-17α	354 (0,71) 427 (0,38)	318 (0,21) 395 (0,22)	450	480	363 (1,17) 450 (0,23)	270 ° 414 (0,13)
Estradiol-16α			450	480		
Estradiol-16β			450	480		
Estriol	276 (0,32) E 287 (0,37) E 299 (0,37) 450 (0,69)	259 (0,20) 373 (0,04)	450	475	306 (0,17) 450 (0,07)	257 (0)° 373 (0)°
16-Epi-estriol	299 (0,44) 450 (0,61)	258 (0,18) 365 (0,05)	450	475	233 (0,27) E 306 (0,19) 358 (0,05) 445 (0,25)	258 (0,02)° 332 (0,03) 385 (0,03)
17-Epi-estriol	232 (0,36) E 300 (0,65) 448 (0,37)	254 (0,11) 365 (0,05)	450	470	232 (0,29) 302 (0,44) 446 (0,25)	254 (0,04) 360 (0,01)°
16,17-Epi-estriol	300 (0,71) 448 (0,44)	250 (0,1) 365 (0,04)°	450	480	300 (0,75) 448 (0,36)	255 (0,1)° 365 (0,04)°

TABLEAU II (Suite)

Composé	10 minutes - 100°C				2 heures - 25°C	
	Absorption		Excitation	Fluorescence	Absorption	
	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)	λ max	λ min	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)
16α-Hydroxy-estrone	288 (0,27)° 483 (0,99)	363 (0,12)	470	525	292 (0,15)° 355 (0,21)	316 (0,07) 397 (0,11)
16β-Hydroxy-estrone	288 (0,27)° 333 (0,22)°	266 (0,25) 305 (0,16)°	470	520	294 (0,17) 378 (0,22) 484 (0,55)	262 (0,07)° 323 (0,08)
7α-Hydroxy-estradiol	300 (0,46) 451 (0,86)	251 (0,13)° 385 (0,14)°	450	480	273 (0,19) 305 (0,16)° 451 (1,86)	251 (0,13) 285 (0,13)° 335 (0,12)
6-Oxo-estrone	236 (0,7)° 299 (0,95)	254 (0,52)	400	450	299 (0,57) 375 (0,08)	257 (0,04)° 330 (0,02)
6-Oxo-estradiol	237 (0,8)° 297 (0,95) 425 (0,2) E 530 (0,15) E	254 (0,67)°	400	450	303 (0,81) 415 (0,18)° 476 (0,07) E	335 (0,05)
16-Oxo-estrone	230 (0,29) E 320 (0,29) E		455	510	305 (0,09)° 363 (1,2)°	275 (0,04)° 328 (0,07)
16-Oxo-estradiol	290 (0,28)° 326 (0,26)° 476 (0,78)	260 (0,24) 306 (0,24) 365 (0,09)	465 475 485	530	292 (0,18) 365 (0,2) E 390 (0,21)° 482 (0,48)	260 (0,1)° 322 (0,09) 401 (0,13)
Estrone-16			465	515		
17-Desoxo-estrone			460	488		

TABLEAU II (Suite)

Composé	10 minutes - 100°C				2 heures - 25°C	
	Absorption		Excitation	Fluorescence	Absorption	
	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)	λ max	λ max	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)
Estrone, 3-Me*	300 (0,42) 453 (1,05)	253 (0,16)° 365 (0,05)°	460	480	200 (0,45)° 300 (0,47) 453 (0,57)	253 (0,12)° 365 (0,04)°
Estradiol, 3-Me	272 (0,33)° 430 (0,98) 453 (0,5) E	250 (0,23)° 353 (0,1)°	460	480	372 (0,63) 453 (0,68) 430 (0,56) E	398 (0,12)
Estradiol-17α, 3-Me	369 (0,51) 432 (0,27) E 454 (0,36)	320 (0,12) 409 (0,17)	465	490	371 (0,95) 454 (0,11)	420 (0,07)
16α-Hydroxy-estrone,3-Me			465 480 490 520	545		
16-Oxo-estradiol,3-Me	291 (0,21)° 483 (0,81) E 501 (0,84)	365 (0,07)	465	530	291 (0,11) 359 (0,22) 502 (0,88) 570 (0,08)	314 (0,04) 402 (0,08)
Estradiol-16β, 3-Me			470	490		
Estriol, 3-Me			460	480		
16-Epi-estriol, 3-Me			460	480		
17-Epi-estriol, 3-Me	278 (0,29)° 456 (0,9)	263 (0,27) 326 (0,08)	460	480	288 (0,29) 467 (0,38)	263 (0,24)° 360 (0,12)°
16,17-Epi-estriol,3-Me			460	480		
Estrone-16, 3-Me			470	510		
16-Oxo-estrone, 3-Me			470	520		

TABLEAU II (Suite)

Composé	10 minutes -100°C				2 heures - 25°C	
	Absorption		Excitation	Fluorescence	Absorption	
	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)	λ max	λ max	λ max (D.O.)	λ min (D.O.)
Estrone, 3-E**			465	490		
16α-Hydroxy-estrone, 3-E			465 480 490 520	545		
Estriol, 3-E			450	480		
16-Epi-estriol, 3-E			455	480		
2-Methoxy-estrone	299 (0,75) 380 (0,2) E 465 (0,21)	257 (0,44) 405 (0,15)	450	475	308 (0,4) 370 (0,16)° 485 (0,2)	251 (0,03) 330 (0,1) 405 (0,08)
2-Methoxy-estradiol	292 (0,37)° 365 (0,26)° 460 (0,35)	262 (0,3)° 328 (0,22) 395 (0,15)	470	530	264 (0,1)° 357 (0,41)	250 (0,07)° 288 (0,05)
2-Methoxy-estrone, 3-Me	296 (0,84) 469 (0,35)	259 (0,46) 400 (0,06)	435 °	470	305 (0,2)° 360 (0,24)° 376 (0,2) E 469 (0,2)	248 (0,1)° 324 (0,15)° 400 (0,13)

N.B. λ = Longueur d'onde
E = Epaulement ou inflexion
* = 3-Methyl-ether = 3-Me
° = Maximum ou minimum peu défini ou très étalé
D.O. = Densité optique
** = 3-Ethyl-ether = 3-E

TABLEAU III

SPECTRES DES COMPLEXES DE KOBER

Composé	KOBER selon JAYLE		KOBER selon ITTRICH		
	Remarque	Absorption	Absorption	Excitation	Fluorescence
		λ max (a_M)	λ max (a_M)	λ max	λ max
Estrone	jaune en 2'	513 (40 830)	510 E 537 (53 400)	540	550
Estradiol	jaune en 2'	515 (21 792)	510 E 537 (31 326)	540	550
Estradiol-17α	jaune à froid	517 (25 605)	510 E 537 (28 600)	540	550
Estradiol-16α	jaune en 2'puis orange	517 (21 792)	510 E 537(24 110)	540	550
Estradiol-16β	jaune en 2'	517 (21 792)	510 E 537 (23 835)	540	550
Estriol	jaune en 5'	513 (31 147)	510 E 537(49 800)	540	550
Estriol-16 Epi	jaune en 2' puis rose	513 (22 945)	510 E 537 (23 790)	540	550
Estriol-17 Epi	jaune en 2'	500 E 513 (37 492)	510 E 537 (53 350)	540	550
Estriol-16,17 Epi	jaune en 2'	500 E 516 (36 336)	510 E 537 (36 770)	540	550
16α-Hydroxy-estrone	rose en 2'	513 (38 091)	510 E 537 (43 676)	540	550
16β-Hydroxy-estrone	rose en 2'	490 E 513 (38 091)	510 E 537 (50 836)	540	550
7α-Hydroxy-estradiol	jaune en 2'	372 516 (16 996)	510 E 537 (10 815)	540	550

TABLEAU III (Suite)

Composé	KOBER selon JAYLE		KOBER selon ITTRICH		
	Remarque	Absorption λ max (a_M)	Absorption λ max (a_M)	Excitation λ max	Fluorescence λ max
6-Oxo-estrone	rose-mauve, détruit au 2è stade	553 (3 015)	-	535	550
6-Oxo-estradiol	rose-mauve, détruit au 2è stade	553 (4 009)	-	535	550
16-Oxo-estrone	incolore	-	-	540	550
16-Oxo-estradiol	jaune en 2'puis orange	520 (37 809)	510 E	540	550
17-Desoxo-estrone	incolore	-	-	-	-
Estrone-16	incolore	-	-	-	-
2-Methoxy-estrone	rose-mauve en 2'	426 546 (23 431)	567 (16 522)	425	590
2-Methoxy-estradiol	rose-mauve en 2'	546 (19 656)	567 (17 390)	540	550
2-Methoxy-estradiol, 3-Me*	rose-mauve en 2'	548 (22 148)	578 (15 030)	540	550
2-Methoxy-estrone, 3-Me	rose-mauve en 2'	548 (26 095)	576 (18 860)	430 580	595
Estrone, 3-E**	jaune en 2'	500 E 518 (39 986)	539 (38 790)	540	550
16α-Hydroxy-estrone, 3-E	rose en 2'	518 (42 130)	539 (34 580)	540	550
Estriol, 3-E	orange en 5'puis rose	518 (34 171)	510 E 539 (45 880)	540	550
16-Epi-estriol, 3-E	jaune en 2'puis rose	518 (41 765)	510 E 539 (45 880)	540	550

TABLEAU III (Suite)

Composé	KOBER selon JAYLE		KOBER selon ITTRICH		
	Remarque	Absorption λ max (a_M)	Absorption λ max (a_M)	Excitation λ max	Fluorescence λ max
Estrone, 3-Me	jaune en 2' puis rose	516 (43 798)	510 E 537 (42 660)	540	550
Estradiol, 3-Me	jaune en 2'	418 490 E 516 (28 067)	510 E 537 (26 490)	540	550
Estradiol-17α, 3-Me	jaune en 2'	520 (27 780)	510 E 537 (23 630)	540	550
Estradiol-16β, 3-Me			510 E 538 (19 332)	540	550
16α-Hydroxy-estrone, 3-Me	rose à froid	518 (39 653)	510 E 537 (36 050)	540	550
16-Oxo-estradiol, 3-Me	rose en 2'	490 E 516 (45 961)	510 E 537 (45 060)	540	550
Estriol, 3-Me	jaune en 5'	516 (30 845)	510 E 537 (38 560)	540	550
16-Epi-estriol, 3-Me	jaune en 2'puis orange	510 E 516 (43 243)	510 E 537 (43 090)	540	550
17-Epi-estriol, 3-Me	jaune en 2' puis rose	516 (25 704)	536 (18 144)	540	550
16,17-Epi-estriol, 3-Me	jaune en 2'	518 (41 226)	537 (18 140)	540	550
Estrone-16, 3-Me	incolore	-	-	540	550
16-Oxo-estrone, 3-Me	incolore	-	-	-	-

N.B. λ = Longueur d'onde
a_M = Absorptivité moléculaire
E = Inflexion

x = 3-Méthyl-ether = 3-Me
xx = 3-Ethyl-ether = 3-E

TABLEAU IV

COMPARAISON DES ABSORPTIVITES MOLECULAIRES DES ESTROGENES PAR RAPPORT A L'ESTRONE

	KOBER			ITTRICH		
	Dérivé	Ether méthylique	Ether éthylique	Dérivé	Ether méthylique	Ether éthylique
Estrone	1	1,02	0,89	1	0,76	0,66
Estradiol-17β	0,53	0,65		0,59	0,47	
Estradiol-17α	0,62	0,64		0,53	0,42	
Estradiol-16α	0,53			0,47		
Estradiol-16β	0,53			0,44	0,36	
Estriol-16α,17β	0,71	0,69	0,71	0,87	0,65	0,73
Estriol-16β,17β	0,52	0,95	0,87	0,42	0,70	0,73
Estriol-16β,17α	0,82	0,90		0,65	0,30	
Estriol-16α,17α	0,85	0,55		0,80	0,30	
16α-hydroxy-estrone	0,87	0,87	0,89	0,77	0,61	0,56
16β-hydroxy-estrone	0,87			0,90		
7α-hydroxy-estradiol	0,39			0,19		
6-oxo-estrone	0,07			-		
6-oxo-estradiol	0,09			-		
16-oxo-estrone	-			-		
16-oxoestradiol	0,87	1,01		1,06	0,76	
2-méthoxy-estrone	0,52	0,55		0,28	0,30	
2-méthoxy-estradiol	0,43	0,46		0,29	0,24	
17-desoxo-estrone	-			-		
Estrone-16	-	-		--	-	

a) Schéma général

Dans l'acide phosphorique, l'estrone présente un maximum d'absorption à 458 nm et un épaulement à 510 nm, mais pas de minimum net. Le spectre d'excitation présente un maximum à 460 nm et le maximum de fluorescence est situé à 480 nm.

Dans l'acide sulfurique, après 10 minutes d'ébullition, l'estrone absorbe la lumière à 300 nm et présente un maximum secondaire d'absorption à 449 nm. Il y a un minimum net à 250 nm et un autre moins net à 370 nm. L'excitation maximum est obtenue à 450 nm et la fluorescence à 480 nm.

Au cours de la réaction de Kober, une coloration jaune apparait après deux minutes d'ébullition; le chromophore de Kober possède un pouvoir d'absorption maximal à 513 nm et le spectre présente également une légère inflexion vers 490 nm.

Le chromophore de Kober extrait selon Ittrich présente une absorption maximale à 537 nm, est excité au maximum à 540 nm et sa fluorescence est maximale à 550 nm.

b) Particularités de quelques dérivés

L'estradiol-17α a un comportement unique au cours de la réaction de Kober : à froid, dès l'addition d'acide, il donne naissance à un complexe coloré jaune intense.

On observe pour les dérivés 16-hydroxylés de l'estrone un déplacement bathochromique des maximums des spectres obtenus après les réactions dans les acides sulfurique et phosphorique.

La 16-oxoestrone a un comportement particulier pour chaque type de réaction, se manifestant soit par l'absence de bandes d'absorption, soit par un maximum très faible et déplacé vers les hautes longueurs d'onde.

Par contre, on constate un effet hyperchromique pour le 16-oxo-estradiol, le maximum de chaque spectre (sauf pour le composé Ittrich) étant différent de ceux des autres dérivés.

Pour chaque type de spectre envisagé, on a constaté pour les éther-oxydes méthyliques et éthyliques un effet bathochromique de quelques nanomètres par rapport à l'estrogène dont ils dérivent. Le dérivé méthylique de la 16α-hydroxyestrone est particulièrement différent de la 16α-hydroxyestrone elle-même, par la position de ses maximums. Par ailleurs, au cours de la réaction de Kober, la coloration rose apparait à froid, dès la mise en contact avec l'acide.

Les dérivés 2-méthoxylés sont très caractéristiques : dans l'acide phosphorique, les maximums d'absorption sont décalés vers les courtes longueurs d'onde mais les spectres de fluorescence sont peu nets. Dans l'acide sulfurique, ces dérivés présentent un maximum d'absorption caractéristique entre 460 et 470 nm. Leur chromophore de Kober, d'une coloration mauve unique, absorbe à 547 nm. Au cours de la réaction d'Ittrich, enfin, le composé obtenu n'est coloré de manière visible qu'après 15 minutes d'ébullition et le spectre présente un fort effet batho- et hypochromique (568 nm pour le maximum).

Enfin, la 17-desoxoestrone et l'estrone-16 se caractérisent par une réponse très faible ou nulle au cours des différentes réactions.

E) - DISCUSSION

1) Spectres dans l'acide phosphorique

Peu d'auteurs ont étudié le spectre des estrogènes traités par l'acide phosphorique. HIRSHMAN H. (1952), et JONES & HERLING (1956) ont donné les caractéristiques des spectres d'absorption pour les trois estrogènes principaux, les maximums et minimums étant nombreux et différents pour chaque stéroïde. Nos résultats, par contre, montrent une grande analogie entre l'estrone, l'estradiol et l'estriol ainsi d'ailleurs qu'avec leurs dérivés. Les maximums sont situés entre 300 et 515 nm, les minimums sont inexistants ou peu nets.

L'adjonction d'une fonction méthylique en position 3 exerce un effet bathochromique peu intense mais régulier. Par contre, une fonction méthoxylique introduite en position 2 exerce un effet

inverse et beaucoup plus prononcé. La présence simultanée des deux effets dans les dérivés 2-méthoxy,3-méthyl ethers se traduit par une prépondérance de l'effet hypsochromique.

La présence simultanée d'une fonction cétone et d'une fonction hydroxyle en position 16 et 17 de la molécule se manifeste par un fort effet bathochromique. Le maximum du spectre de fluorescence de ces quelques stéroïdes est déplacé dans le même sens que les maximums d'absorption.

La 16-oxoestrone, l'estrone-16 et la 17-desoxoestrone donnent naissance à un composé fluorescent dont le maximum est situé à une longueur d'onde caractéristique. Nous verrons que la réaction dans l'acide phosphorique est la seule permettant d'obtenir un composé fluorescent avec ces trois stéroïdes.

Enfin, les dérivés 6-cétoniques de l'estrone et de l'estradiol ont des maximums d'absorption, d'excitation et de fluorescence très décalés vers les courtes longueurs d'onde.

2) Les spectres des stéroïdes phénoliques en milieu sulfurique sont assez peu différents de ceux obtenus en milieu phosphorique (figures 3-6). La plupart ont un maximum d'absorption situé vers 300 nm et un autre vers 450 nm. AXELROD (1953), BERNSTEIN et LENHARD (1953), HEARD et O'DONNELL (1954) retrouvent également ces 2 maximums mais en trouvent d'autres supplémentaires à des longueurs d'onde variables, SCHOLLER et col. (1966) notent un seul maximum entre 450 et 460 nm. GIVNER et col. (1960) qui ont également étudié les spectres d'absorption de quelques stéroïdes phénoliques dans l'acide sulfurique à 75 %, donnent des résultats un peu différents, les maximums étant à 285 et 460 nm pour l'estradiol, à 490 nm pour le 16-oxoestradiol et à 515 nm pour la 16α-hydroxy-estrone. Or, pour le 16-oxoestradiol, nous trouvons 4 maximums différents de ceux de l'estrone et situés entre 290 et 480 nm :

le 3-étheroxyde méthylique du 16-oxoestradiol présente d'ailleurs 2 de ces maximums, les 2 autres étant situés à des longueurs d'onde

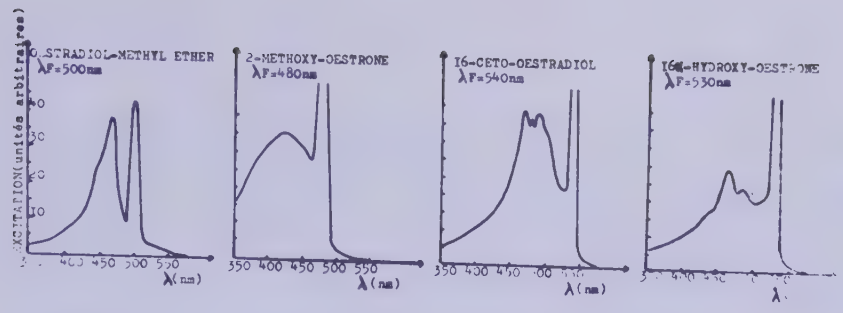


Fig. 3 - Spectres d'excitation dans l'acide phosphorique

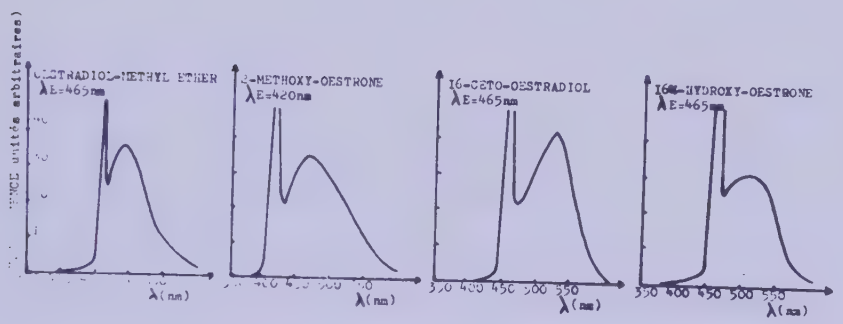


Fig. 4 - Spectres de fluorescence dans l'acide phosphorique

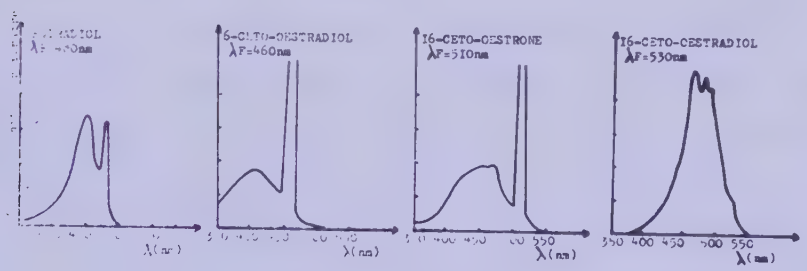


Fig. 5 - Spectres d'excitation dans l'acide sulfurique

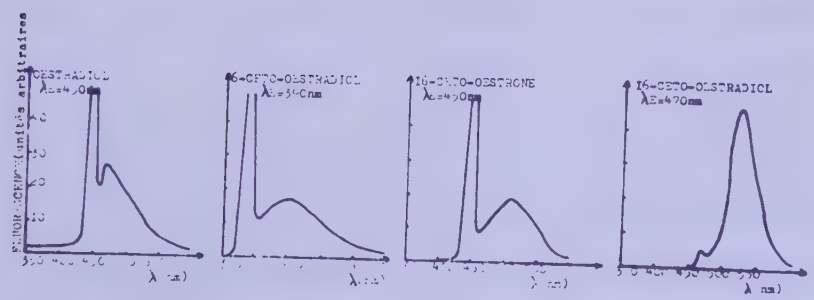


Fig. 6 - Spectres de fluorescence dans l'acide sulfurique

plus élevées, 500 et 570 nm. D'autre part, nous trouvons pour les dérivés 16-hydroxylés de l'estrone, des maximums plus élevés que ceux de l'estrone (SCHOLLER a également constaté ce fait pour la 16α-hydroxyestrone), la différence étant cependant moins prononcée que celle constatée par GIVNER.

Par ailleurs, nous avons comparé les propriétés d'absorption des estrogènes traités par l'acide sulfurique soit à température ambiante, soit après ébullition. En effet, plusieurs auteurs effectuent leurs mesures après avoir laissé les stéroïdes en contact avec l'acide durant 2 heures à la température ambiante. Par cette modalité, nous avons constaté un léger déplacement des maximums et une variation d'intensité de ces maximums, cette différence ne semblant pas significative. Nous préférons donc la modalité plus rapide comportant une simple ébullition de 10 minutes dans l'acide sulfurique avant l'enregistrement des spectres.

Les spectres d'excitation dans l'acide sulfurique sont plus caractéristiques que ceux obtenus dans l'acide phosphorique, les maximums d'excitation étant situés pour la plupart entre 450 et 460 nm et les maximums de fluorescence entre 480 et 490 nm. Les éther-oxydes méthyliques ont, comme dans l'acide phosphorique un maximum de fluorescence déplacé de 5 à 10 nm vers les hautes longueurs d'onde par rapport aux estrogènes libres correspondants. Les dérivés 16-hydroxylés de l'estrone ont également une fluorescence décalée vers 530 nm. Le 16-oxoestradiol, qui est fluorescent à une longueur d'onde particulièrement haute, a un spectre d'excitation caractéristique analogue à celui obtenu dans l'acide phosphorique. De même, la 16-oxo-estrone possède un maximum de fluorescence très faible décalé dans le même sens. Ces constatations confirment l'hypothèse soulevée précédemment d'après laquelle la présence simultanée d'une fonction cétone et d'une fonction hydroxyle en position 16 et 17 du noyau D exercerait un effet bathochromique. La présence de deux fonctions cétone en ces deux mêmes positions exerce un effet batho- mais surtout hypochromique de la fluorescence.

La 17-desoxoestrone et l'estrone-16 sont également très peu

fluorescentes. L'absence de fonction oxygénée en C-17 se manifeste donc par une disparition de la caractéristique de fluorescence. Une fonction cétonique introduite en position 6 exerce un effet hypsochromique (6-oxo-estrone et 6-oxo-estradiol).

Parmi tous les estrogènes étudiés, un seul ne présente pas le phénomène d'absorption dans les acides sulfurique et phosphorique : c'est la 16-oxo-estrone; mais tous possèdent la propriété d'excitation et de fluorescence soit dans un des deux acides, soit dans les deux. SLAUNWHITE (1953) nie la capacité de fluorescence chez les stéroïdes ne présentant pas de carbonyl en position 17 de la molécule ou dont le carbonyl est déplacé en 16, ou chez les stéroïdes ayant une fonction cétone supplémentaire en 6, 7 ou 16. Nous avons pour notre part observé pour ces stéroïdes des maximums de fluorescence bien différenciés (notamment le 16-oxo-estradiol).

L'action des acides phosphorique et sulfurique sur les stéroïdes phénoliques est intéressante d'un point de vue qualitatif, certains stéroïdes pouvant être ainsi identifiés par leur comportement caractéristique dans ces acides, alors que par réaction de Kober, ils ne se distinguent pas des autres estrogènes.

Par ailleurs, d'un point de vue quantitatif, seuls ces deux acides ont une action mesurable sur certains estrogènes, tels les dérivés non oxygénés en C 17.

3) Chromophore de Kober

a) Conditions structurales

En 1969, JONES et HAHNEL ont étudié en détail le chromophore de Kober et ont tenté d'expliquer le processus de sa formation et son comportement : une réponse positive au test de Kober implique la formation d'un chromogène rose absorbant entre 500 et 535 nm si les estrogènes sont traités par les réactifs spécifiques de Brown (H_2SO_4 21,23 ou 26N) et dans la région située entre 510 et 555 nm s'ils sont traités par la réaction d'Ittrich. Or, d'après ces mêmes auteurs, un estrogène ne peut donner ce chromogène rose

que s'il possède certains caractères de structure notamment, soit une double liaison en C 16-C 17, soit une fonction oxygénée en C 16 ou C 17. En effet, le premier stade de la réaction impliquerait une déshydratation au niveau du site oxygéné du noyau D, c'est-à-dire passage à une structure comportant une double liaison entre les carbone 16 et 17, et qui serait suivie d'une migration du méthyl angulaire de C 13 en C 17. S'il y a une fonction cétone en C 16 seulement, on ne peut voir apparaitre un chromogène que si la quantité de stéroïde utilisé est supérieure à 100 µg. Il peut y avoir une fonction oxygénée aux deux positions C 16 et C 17 sauf si ce sont deux fonctions cétone; dans ce dernier cas, le chromogène n'est pas formé quelle que soit la quantité de stéroïde utilisée. Il faut de plus que le noyau A soit aromatique ou le devienne au cours de la réaction. Enfin, le noyau A doit posséder une fonction alcool ou un groupement méthoxyl en C 2 ou C 3.

Les conditions d'apparition du chromogène de Kober ont également été définies par MARLOW : la molécule de stéroïde doit posséder une fonction oxygénée en C 17, un noyau D intact et un groupement phénolique en C 3. La présence de 2 fonctions cétone en C 16 et C 17 inhibe la formation du chromophore. Cet auteur n'a pu mettre en évidence un chromogène avec l'estrone-16 non plus qu'avec la 2-méthoxy-estrone ou le 17-méthyl-estradiol.

De notre côté, nous confirmons que l'absence de fonction oxygénée en C 16 et C 17 (17-desoxoestrone, p. ex.) inhibe la réaction de Kober. De même, une fonction cétone isolée en C 16 inhibe presque totalement la réaction (estrone-16 ou son éther-oxyde méthylique). Par contre, une fonction alcool isolée en C 16 (estradiol-16α ou 16β) donne une réaction positive. Enfin, deux fonctions cétoniques adjacentes en 16 et 17 inhibent la réaction de Kober (16-oxoestrone et son éther méthylique).

b) Caractéristiques spectrales

La majeure partie des chromogènes de Kober formés par les estrogènes absorbent la lumière entre 510 et 520 nm. Quelques dérivés se différencient néanmoins : les 2-méthoxy- et les

2-méthoxy,3-éther-oxydes méthyliques de l'estrone et de l'estradiol présentent un maximum d'absorption à 546 nm; de même, les 6-oxo-estrone et 6-oxo-estradiol ont un maximum d'absorption très faible situé à 553 nm. Les autres estrogènes ont un maximum situé à une longueur d'onde inférieure à 520 nm.

D'après MARLOW (1950), la 2-méthoxy-estrone ne donne pas de chromogène de Kober. JONES et HAHNEL (1969) n'obtiennent pas de chromogène avec le 3-éther-oxyde méthylique du 2-méthoxy-estriol; il en conclue que la présence de 2 groupements méthoxyliques ou d'un groupement méthoxylique adjacent à une fonction hydroxyle dans le noyau A est inhibitrice de l'apparition du chromogène. D'après nos résultats, les dérivés 2,3-diméthoxyliques de l'estrone forment un complexe de Kober ayant un maximum d'absorption net à 548 nm (figure 7). BREUER (1965) n'obtient pas de chromogène de Kober avec les 11-oxo-estrone et -estradiol, avec la 11β-hydroxy-estrone, les 16- et 6-oxoestrone. Nous n'avons pas étudié les 3 premiers de ces dérivés; par contre, nous obtenons le même résultat pour la 16-oxo-estrone mais non pour la 6-oxo-estrone. En effet, cet estrogène ainsi d'ailleurs que le 6-oxo-estradiol forment un chromophore assez instable mais possédant un pouvoir d'absorption réel bien que peu intense.

c) Comportement des estrogènes au cours de la réaction

La réaction de Kober se passe en 2 stades : tout d'abord, l'estrogène est chauffé en présence d'acide sulfurique concentré; il y a alors formation plus ou moins rapide d'un composé coloré jaune absorbant vers 450 nm. Au cours du deuxième stade comportant une dilution et un nouveau chauffage, le pigment jaune se transforme en un chromophore rose absorbant vers 520 nm. NOCKE (1961) pense que le premier pigment jaune se transforme déjà en partie en un complexe rose dès le permier stade de la réaction, la deuxième étape ne servant qu'à activer la transformation.

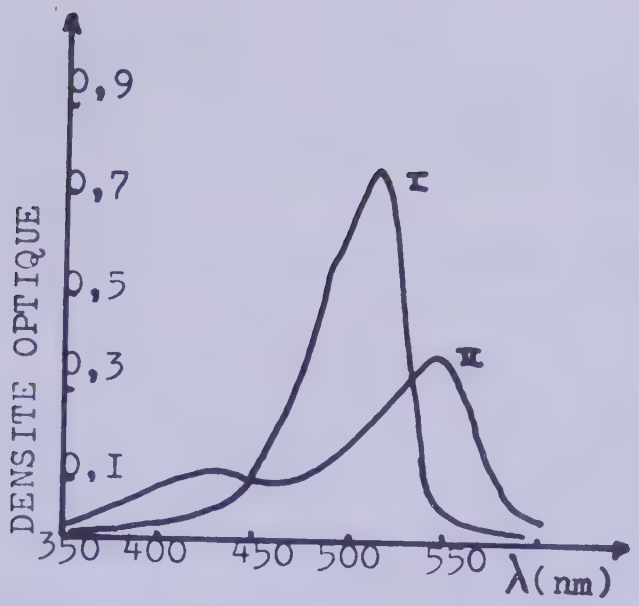


Fig. 7 - Spectre d'absorption après réaction de Kober selon Jayle
I, Estrone; II, 2-méthoxy-estrone.

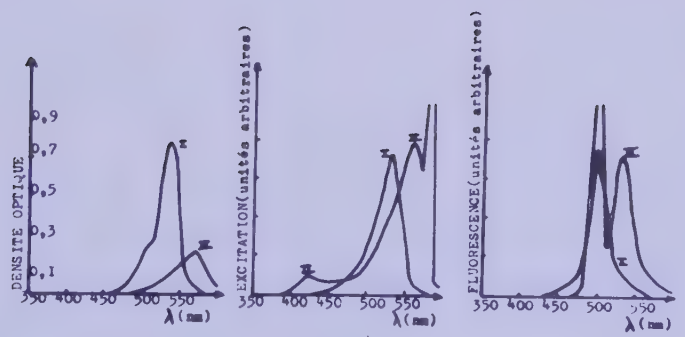


Fig. 8 - Spectres d'absorption, d'excitation et de fluorescence
après réaction d'Ittrich.
I, Estrone; II, 2-méthoxy-estrone.

Au cours de notre travail, nous avons observé les changements de coloration subis par les stéroïdes phénoliques pendant la réaction. Certains estrogènes ont un comportement très caractéristique :

- l'estradiol-17α devient jaune dès l'addition d'acide, avant d'être chauffé. NOCKE avait déjà constaté cette particularité.

- le 3-éther-oxyde méthylique de la 16α-hydroxyestrone donne directement un composé rose, à froid, dès l'addition d'acide. Une douzaine de dérivés dont les dérivés 16-hydroxylés de l'estrone présentent cette même particularité, mais après quelques minutes d'ébullition. Ce fait semble confirmer l'hypothèse de NOCKE, citée plus haut, et d'après laquelle le composé rose se formerait dès le premier stade, avec plus ou moins d'intensité.

- l'estriol-16α,17β et ses 3-éther-oxydes éthylique et méthylique sont les seuls stéroïdes phénoliques dont la transformation en complexe coloré jaune ne soit visible qu'après 5 minutes d'ébullition, les 3 épimères de l'estriol et leurs dérivés répondant aussi rapidement que les autres estrogènes (< 2 min.). NOCKE (1961) ainsi que MARLOW (1950), et MARRIAN et BAULD (1955) avaient déjà remarqué que la coloration dans les deux stades de la réaction se développait plus rapidement pour le 16-épiestriol que pour l'estriol. BROWN (1952) et BAULD (1954) avaient émis l'hypothèse que le premier stade de la réaction impliquait une déshydratation en estrone, ceci se réalisant plus facilement avec la configuration cis-glycol que trans-glycol.

- les dérivés 2-méthoxy et 2-méthoxy,3-éther-oxydes méthyliques de l'estrone et de l'estradiol donnent un chromogène mauve très caractéristique dès la deuxième minute d'ébullition. Cette différence de coloration se traduit par un fort décalage des longueurs d'onde d'absorption.

- les 6-oxo-estrone et 6-oxo-estradiol montrent également une

coloration rose mauve très pâle qui disparait au cours du deuxième stade de la réaction. L'étude du spectre d'absorption de ces composés permet de noter une absorbance très faible dans une zone de longueurs d'onde très décalée vers les hautes valeurs.

d) Modification du chromophore de Kober dans la réaction d'Ittrich.

L'extraction du chromophore de Kober en tant que solvant organique tel que le chloroforme, rend le spectre très uniforme d'un estrogène à l'autre. Ainsi, presque tous les spectres d'absorption ont un maximum net à 537 nm ainsi qu'un point d'inflexion plus ou moins net à 510 nm. De même que dans la modalité simple de Kober, les 2-méthoxy et les 2-méthoxy,3-méthyléthers de l'estrone et de l'estradiol ont un maximum d'absorption déplacé de 30 à 40 nm vers les hautes longueurs d'onde (figure 8). Par contre, les 6-oxo-estrone et -estradiol ont perdu le faible pouvoir d'absorption qu'ils possédaient en tant que chromophores de Kober.

Les 3-éther-oxydes éthyliques des stéroïdes phénoliques ont un maximum d'absorption décalé de quelques nanomètres vers les grandes longueurs d'onde.

Au cours de la réaction d'Ittrich, les estrogènes deviennent jaunes, puis oranges et enfin roses, la coloration se stabilisant après 20 à 30 minutes d'ébullition. De même que dans la réaction précédente, les dérivés 2-méthoxy-estrogènes se distinguent par leur coloration mauve qui reste stable après 10 minutes d'ébullition. Les 6-oxo-estrone et estradiol prennent une coloration rose dont l'intensité est maximum après 10 minutes d'ébullition mais qui n'est pas extraite par le chloroforme.

e) Excitation et fluorescence du chromogène d'Ittrich.

Après la réaction d'Ittrich, le composé coloré formé possède non seulement des propriétés d'absorption de la lumière, mais il est en outre fluorescent lorsqu'il est soumis à une lumière excitatrice, monochromatique et dont la longueur d'onde est choisie

après étude du spectre d'excitation. Les spectres d'excitation et de fluorescence, très semblables pour la plupart des dérivés étudiés, présentent un maximum à 540 et 550 nm respectivement. La précision, de 5 nm, est conditionnée par la précision du spectrofluoromètre Farrand que nous avons utilisé pour cette étude.

Les dérivés pour lesquels nous n'avions pas obtenu de complexe de Kober se révèlent non fluorescents : 17-desoxoestrone, estrone-16 et son 3-éther-oxyde méthylique. Cependant, la réaction de fluorescence étant beaucoup plus sensible que la mesure de l'absorbance, il nous a été possible de mesurer une légère fluorescence pour les 6-oxo-estrone et -estradiol ainsi que pour la 16-oxo-estrone pour lesquels nous n'avions pu mesurer aucune absorbance. Cette fluorescence n'est cependant pas utilisable pour une détermination quantitative des 6-oxo-estrogènes. STASTNÝ et DUBEY (1970) ont réalisé une étude très intéressante des conditions optimales d'obtention des composés Ittrich fluorescents avec les estrogènes substitués en C-6 : si les 6-hydroxy-estrogène donnent naissance à une fluorescence quantifiable, il n'en est pas de même avec les 6-oxo-estrogènes quelles que soient les conditions.

Les dérivés 2-méthoxylés de l'estrone sont les seuls estrogènes qui présentent des longueurs d'onde de fluorescence caractéristiques.

La modification apportée par Ittrich à la réaction de Kober, n'apporte donc pas d'avantages pour l'identification des stéroïdes phénoliques et leur différenciation les uns des autres. Par contre, cette réaction est très spécifique de ce groupe de stéroïdes. Elle est également infiniment plus sensible et c'est ce qui lui a valu d'être la principale méthode de dosage des estrogènes pendant un grand nombre d'années. Quelques modifications lui ont été apportées par certains auteurs : STASTNÝ et DUBEY (1972) ont réalisé un travail important en définissant pour une vingtaine d'estrogènes physiologiques les conditions optimales de température, de temps de chauffage, de dilution d'acide ainsi que de solvant d'extraction du composé Ittrich. Pour ce dernier point, il semble qu'après

comparaison du tétrachloréthane, du chloroforme et du tétrabrométhane, la plus forte intensité de fluorescence soit obtenue avec le premier de ces solvants, le tétrabrométhane étant le moins efficace. SCHOLLER et coll. (1966) ont également comparé l'efficacité de ces 3 solvants : d'après leurs conclusions, si le tétrachloréthane permet une plus forte fluorescence, la séparation des phases aqueuse et organique se révèle plus délicate avec ce solvant. La manipulation du tétrachloréthane étant par ailleurs plus dangereuse et plus désagréable, nous avons préféré l'emploi du chloroforme lors de notre application au dosage des estrogènes plasmatiques.

Les résultats acquis au cours de cette étude systématique ont permis de montrer qu'il était possible de trouver dans l'ensemble des données spectrales exposées une ou plusieurs particularités propres à chacun des stéroïdes étudiés ou à l'un de ces dérivés obtenus par méthylation, éthylation, réduction, etc... Ces données peuvent ainsi contribuer à l'identification de ces stéroïdes.

D'un point de vue quantitatif, seule l'étude de la fluorescence du composé d'Ittrich se révèle utile, l'extraction du chromophore de Kober en milieu organique permettant non seulement une très grande sensibilité, mais également la séparation d'avec les nombreuses substances interférentes présentes dans les milieux biologiques.

CHAPITRE II

DETERMINATION DES ESTROGENES PLASMATIQUES TOTAUX PAR FLUOROMETRIE

Les données fluorométriques exposées dans le chapitre précédent ont pu être utilisées pour doser les estrogènes plasmatiques après hydrolyse chlorhydrique du plasma, extraction et fractionnement. Ce chapitre présente la méthode utilisée, dérivée de celle décrite par ROY (1962) et les modifications de cette technique afin d'améliorer la spécificité et la sensibilité des déterminations. Nous exposons les problèmes rencontrés à chaque étape ainsi que la manière dont nous les avons résolus.

Les applications de cette technique à divers cas cliniques qui ont pu nous être soumis (kystes, cas de cancérologie mammaire, etc...) sont tout d'abord présentées. La fonction lutéale du corps jaune cyclique et pseudogestatif, qui est le but général de la partie physiologique de ce travail de thèse, a été abordée par la détermination des taux d'estrogènes totaux plasmatiques dans le sang périphérique dans les cas de stimulation ovarienne.

Les cas divers exposés amènent une discussion critique de ces méthodes et de leurs limites d'application.

A) - MATERIEL et METHODES

1) Réactifs

- HCl concentré (Billault), Na_2CO_3 et $NaHCO_3$ (BLB), NaOH (BLB), H_3PO_3 (BLB), H_2O_2, 110 volumes (Prolabo); tous ces réactifs, pour analyse, ont été utilisés sans purification supplémentaire.

- Ether éthylique (Melle), méthanol (Merck), n-hexane (BLB), diméthylsulfate (Merck), éther de pétrole (point d'ébullition 40-60°C, BLB), sont distillés avant usage.

- L'éthanol absolu (Melle) a été débarrassé des aldéhydes de la façon suivante : 5 g d'hydrochlorure de métaphénylène diamine sont ajoutés par litre d'alcool; le mélange est laissé en contact pendant 24 heures sous agitation puis soumis à une ébullition à reflux pendant 8 heures. Après décantation du mélange pendant une nuit, l'éthanol est distillé puis conservé au froid dans des bouteilles brunes.

- Le p-nitrophénol provient des Laboratoires du Bois de Boulogne (BLB), pur. La préparation d'une solution chloroformique à 2 % (p/v) du p-nitrophénol est facilitée par l'addition de 1 % d'éthanol.

- Chloroforme BLB, pour analyse.

- H_2SO_4 BDH (Réactif Analar).

- Alumine basique Woelm, désactivée par l'addition de 13 % d'eau.

- Traceurs radioactifs : l'estrone-6,7-^{3}H (0,0095 mg/mCi), l'estradiol-6,7-^{3}H (0,0066 mg/mCi) et l'estriol-6,7-^{3}H (0,0193 mg/mCi) sont des produits NEN. Ils ont été purifiés par trois chromatographies successives sur plaque, sur papier et sur colonne de célite. Les systèmes de chromatographie sur couche mince sont :

a) Chloroforme/éthanol (9/1),

b) Chlorure de méthylène/acétate d'éthyle (1/9),

le support étant le gel de silice fluorescent Merck HF_{254}.

Le système de chromatographie sur papier (Whatman n° 1) est le benzène/formamide et la migration est effectuée pendant 2 h 30. La chromatographie sur colonne est réalisée à partir de célite John Manville 545 préalablement purifiée : séchée au four à 400°C pendant 4 heures, puis mise en présence d'acide chlorhydrique 6N durant une nuit et lavée à l'eau jusqu'à disparition de toute trace d'acidité; la célite est ensuite lavée par du méthanol, puis de l'éther et enfin séchée à l'étuve à 37°C puis 48 heures au four à 120°C. La colonne de célite est alors préparée en tassant, par petites fractions, 10 g de célite mélangés à 5 ml de phase stationnaire (méthanol/eau 7/3). Le traceur est déposé sur la

colonne après avoir été repris dans la phase mobile (5 x 1 ml) (isooctane/acétate d'éthyle 15/5). L'estrone et l'estradiol sont élués respectivement dans les 2ème et 8ème volumes de rétention. L'estriol est retenu sur la colonne. L'estriol-6,7-^{3}H est purifié par deux chromatographies sur couche mince dans les systèmes suivants :

a) Chloroforme 100 %. L'estriol ne migre pas et est ainsi débarrassé des substances moins polaires.

b) Tétrahydrofurane/méthanol/ammoniaque (90/9/1). Le Rf de l'estriol est alors de 0,63.

La pureté finale des traceurs a été vérifiée à l'aide d'un radiochromatographe Tracerlab 4 π .

- La radioactivité a été mesurée dans un compteur à scintillation Nuclear Chicago Mark 1. Le liquide de scintillation est composé de 5 g de PPO (Packard) et 0,5 g de diméthyl POPOP (Packard) par litre de toluène (Merck).

2) Hydrolyse et extraction

Notre technique d'hydrolyse ne diffère pas de celle de ROY : 10 ml de plasma sont dilués à 200 ml par de l'eau distillée et amenés à ébullition. Après addition de 30 ml d'acide chlorhydrique concentré, le mélange est soumis à une ébullition à reflux durant une heure. L'hydrolysat est refroidi dans l'eau glacée, puis les stéroïdes sont extraits par deux fois 200 ml d'éther. La phase éthérée est lavée par 80 ml d'une solution de carbonate de sodium à pH 10,5; les estrogènes sont extraits dans 20 ml de soude 2N, cette dernière étant laissée en contact avec l'éther. Les estrogènes sont alors réextraits dans la phase organique par addition de 80 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate à 8 %. L'éther est encore lavé par 20 ml de cette même solution puis par deux fois 10 ml d'eau avant d'être évaporé à sec.

Le problème que nous avons rencontré au cours de cette étape a été la formation d'émulsions considérables pendant l'extraction éthérée de l'hydrolysat. ROY pratique cette extraction en ampoules et centrifuge ultérieurement les émulsions pendant 20 minutes.

Nous avons essayé plutôt d'éviter la formation des émulsions :

a) soit par extraction à pH 9. SOMMERVILLE (1966) extrait l'hydrolysat par l'éther après l'avoir ajusté à pH 9 par de la soude normale. Appliquant cette technique à nos sérums, les émulsions n'ont disparu que lorsque le pH a atteint 9,6. L'efficacité de l'extraction des estrogènes à ce stade donne les résultats suivants : estrone 88% (82 à 96); estradiol 89% (82 à 96); estriol 40% (38 à 43). Les pertes de l'estriol sont donc très importantes.

b) soit par extraction dans un extracteur à boules. L'extraction éthérée a été effectuée dans l'appareil décrit par JAYLE et col.(1962), et représenté sur la figure 9. Sept inversions successives de l'appareil permettent une extraction efficace, les deux phases se mélangeant intimement à leur passage simultané dans le mince tube intermédiaire. Par ailleurs, l'absence de toute agitation permet d'éviter presque totalement la formation d'émulsions.

Les extractions sodiques et les lavages sont effectués dans une ampoule à décantation comme nous l'avons décrit plus haut. Ce dernier procédé a été adopté par la suite.

3) Purification de l' extrait

La technique de ROY ne comporte pas d'étapes intermédiaires entre l'extraction éthérée et la séparation des estrogènes sur colonne. Nous avons introduit une étape supplémentaire afin d'augmenter la spécificité de la technique. La délipidation de l'extrait éthéré sec par de l'hexane est pratiquée de la façon suivante : l'extrait est repris par 4 ml de méthanol aqueux (70 %) puis extrait deux fois par 20 ml d'hexane. La fraction méthanolique contenant les stéroïdes est évaporée à sec et conservée pour les étapes suivantes. Malgré les pertes d'estrogènes subies dans l'hexane (13,2 $\pm$ 2,2 % d'estrone; 5 $\pm$ 1,2 % d'estradiol; 1 % d'estriol), cette étape semble apporter une amélioration importante dans la spécificité.

4) Méthylation

La technique décrite par BROWN (1955) a été appliquée sans

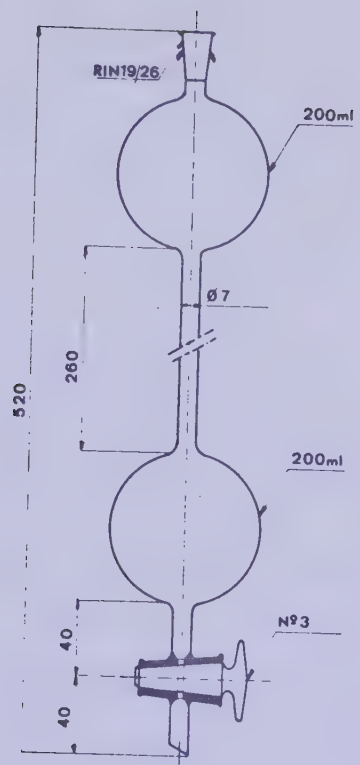


Fig. **9**

Extracteur à boules

modification : après délipidation, l'extrait sec contenant les estrogènes est repris par 1 ml d'éthanol puis par 25 ml de benzène et 25 ml d'éther de pétrole. Un partage de cette solution organique avec 2 x 25 ml d'eau est réalisé :

a) La phase aqueuse contient l'estriol; après addition de 4 ml de soude 5N et 0,9 g d'acide borique, la méthylation est effectuée par 1 ml de sulfate de méthyle durant 30 minutes à 37°C. Une nouvelle méthylation par 1 ml de sulfate de méthyle pendant 20 minutes à 37°C est effectuée après addition de 2 ml de soude 5N. Le mélange est alors additionné de 10 ml de soude 5N et de 2,5 ml d'eau oxygénée, puis l'estriol est extrait par 25 ml de benzène. La phase organique est enfin lavée par deux fois 5 ml d'eau.

b) La phase organique contient l'estrone et l'estradiol. Ceux-ci sont extraits par deux fois 25 ml de soude 0,4N. Après addition de 0,9 g d'acide borique, la méthylation est effectuée à deux reprises comme pour la fraction estriol. L'estrone et l'estradiol méthylés sont extraits de la phase aqueuse par 25 ml d'éther de pétrole. Celui-ci est ensuite lavé par deux fois 25 ml d'eau.

5) Fractionnement sur alumine

- Fraction estriol -

La colonne est préparée à partir de 0,7 g d'alumine dans du benzène saturé d'eau. L'extrait benzènique contenant l'estriol méthylé est versé puis les éluats suivants sont passés sur la colonne :

- 3 ml d'éthanol à 1,4 % dans le benzène; cet éluat n'est pas conservé.
- 9 ml d'éthanol à 2,5 % dans le benzène; cet éluat contient l'estriol et est évaporé à sec.

- Fraction estrone + estradiol

La colonne est préparée à partir de 0,7 g d'alumine dans de l'éther de pétrole saturé d'eau. L'extrait contenant les estrogènes méthylés puis les éluats suivants sont passés sur la colonne :

- 4 ml de benzène/éther de pétrole (25/75); cet éluat n'est pas conservé.
- 8 ml de benzène/éther de pétrole (40/60); cet éluat contient l'estrone.
- 7 ml de benzène 100 %. Cet éluat contient l'estradiol.

Pour ce fractionnement, ROY utilise la colonne décrite par BROWN (diamètre interne 10 mm, porosité n° 3 pour le verre fritté) mais diminue la quantité d'alumine (0,7 g au lieu de 2 g). La hauteur de la colonne est ainsi très réduite de même que son efficacité. Nous avons modifié les constantes physiques de la colonne en même temps que la quantité d'alumine : diamètre interne, 7,5 mm; porosité du verre fritté, n° 0; distance entonnoir verre fritté, 30 mm. La plus grande hauteur d'alumine et l'écoulement plus lent permettent une séparation efficace et régulière.

6) Fluorométrie

La technique d'ITTRICH que nous avons mentionnée précédemment a été adaptée pour le dosage d'extraits plasmatiques : l'extrait sec obtenu après chromatographie est additionné de 0,25 ml d'hydroquinone en solution à 0,4 % dans l'éthanol et est évaporé à sec sous un courant d'azote. 0,2 ml d'eau et 0,37 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés pendant que la solution est refroidie au bain-marie glacé. Le mélange est mis alors à ébullition pendant 40 minutes, puis il est refroidi dans la glace et additionné de 0,75 ml d'eau. Après homogénéisation de la solution, la coloration est extraite par 1,2 ml d'une solution chloroformique de p.nitrophénol. Le mélange est centrifugé et la phase organique est recueillie dans un tube propre. Les spectres de fluorescence sont alors enregistrés sur un spectrophotomètre Farrand dont le monochromateur d'excitation est fixé à 530 nm. L'intensité du maximum de fluorescence (550 nm) est notée pour chaque échantillon. Des volumes de solvant équivalents à ceux utilisés au cours de la chromatographie sur colonne pour l'élution des trois estrogènes sont ajoutés aux standards et aux blancs avant leur évaporation. L'intensité de fluorescence non spécifique due aux blancs est alors soustraite de celle obtenue pour les standards et les échantillons plasmatiques.

B) - CRITERES DE CONFIANCE DE LA METHODE

1) Quenching de fluorescence

Nous avons tenté d'évaluer l'importance du quenching de fluorescence par la méthode de l'étalon interne : l'extrait final

est séparé avant fluorométrie en deux parties égales; à l'une de ces deux fractions, on ajoute 10 ng du dérivé méthylé de l'estrogène concerné, l'autre fraction étant considérée comme blanc de l'échantillon. Le rendement de fluorescence peut être ainsi mesuré et le pourcentage d'inhibition calculé par la différence d'avec 100 %.

Utilisant la technique de ROY telle que celle-ci l'a décrite, le quenching s'est révélé très important et souvent aberrant. Les valeurs moyennes sont les suivantes :

- estrone : 16 % (-19 à + 60) (n = 39)
- estradiol : 45 % (0 à + 77) (n = 37)
- estriol : 41 % (-20 à + 43) (n = 17).

Il y aurait donc dans les sérums analysés non seulement des agents inhibiteurs de la fluorescence, mais également des substances parasites non spécifiques qui intensifient la fluorescence (récupération du standard interne supérieure à 100 %).

L'importance du phénomène de quenching nous a donc amenés à modifier la technique de ROY comme nous l'avons exposé ci-dessus. L'introduction de l'étape de délipidation par l'hexane nous a permis d'abaisser les taux de quenching aux valeurs suivantes ; 24 % pour l'estrone (18 à 39) (n = 9), 14 % pour l'estradiol (6 à 23) (n = 9), et 20 % pour l'estriol (10 à 30) (n = 9). C'est-à-dire que nous avons réussi à supprimer les substances parasites amplifiant non spécifiquement la fluorescence et à obtenir un pourcentage d'inhibition relativement régulier. Nous pouvons ainsi corriger les taux d'estrogènes obtenus pour des échantillons inconnus, par un facteur moyen, ceci permettant une bonne précision sans pour cela avoir à séparer l'extrait final en deux parties; ceci serait en effet impossible pour des sérums peu riches en estrogènes.

2) Exactitude

Nous avons mesuré la récupération des estrogènes au cours de la méthode, d'une part, en surchargeant des sérums avec des quantités d'estrogènes allant de 1 à 10 ng, d'autre part, en utilisant des traceurs radioactifs. Les résultats obtenus par les

deux procédés sont identiques :

- estrone : 66 % (53 à 80)
- estradiol : 60 % (43 à 68)
- estriol : 56 % (41 à 73).

Ces taux de récupération relativement peu élevés sont en accord avec ceux trouvés par ROY.

3) Spécificité

Nous avons enregistré les spectres sur une gamme étendue de longueurs d'onde autour du maximum de fluorescence des estrogènes afin de vérifier, pour chaque échantillon, la spécificité de la mesure. Nous avons éliminé tous les spectres dont le maximum n'était pas situé à 550 nm ou pour lesquels nous n'avons pas trouvé de pic net à cette longueur d'onde. La figure 10 montre les spectres de fluorescence d'une fraction plasmatique d'estriol ainsi que d'une quantité correspondante d'estriol pur.

4) Sensibilité

Grâce aux modifications apportées d'une part à la technique d'ITTRICH (microréaction), d'autre part au processus de purification des extraits plasmatiques, nous avons pu doser des quantités d'estrogènes de l'ordre de 1 ng avec une bonne précision.

C) - RESULTATS

La technique de dosage de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol plasmatiques qui vient d'être décrite a été appliquée tout d'abord à des cas cliniques variés que nous avons eu la chance d'avoir à notre disposition. Une première approche de la fonction hormonale du corps jaune cyclique et pseudo-gestatif de la femme est ensuite présentée.

1) Divers cas cliniques

a) Test ACTH chez des femmes présentant un cancer du sein

La pathogénèse du cancer du sein a depuis longtemps été reliée aux fonctions hormonales. Dès 1896, BEATSON avait constaté une régression totale ou partielle de la tumeur cancéreuse du sein après ovariectomie; cet effet favorable serait dû à la réduction de la

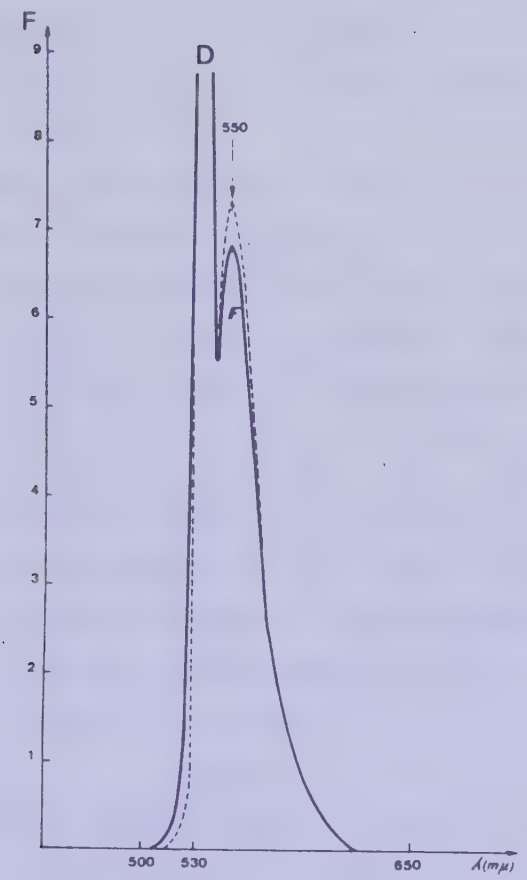


Fig. 10

Superposition des spectres de fluorescence de
- 8.10^3 pg/ml d'estriol (------)
- d'un extrait plasmatique contenant une quantité équivalente d'estriol

production des estrogènes dans l'organisme. Un effet bénéfique analogue a été constaté après surrénalectomie.

Afin de mieux comprendre la composition de l'environnement hormonal dans le cas de cancers mammaires, plusieurs auteurs ont étudié les profils urinaires de différents métabolites hormonaux chez des personnes atteintes de cancer du sein (NISSEN-MEYER et SANNER, 1963; MARMORSTON et col. 1965; LEMON et col. 1966; TSYRLINA et col. 1970 ...).

Nous avons pour notre part tenté d'apporter quelques éléments supplémentaires à cette recherche, en analysant les variations des taux des estrogènes plasmatiques totaux chez des femmes ménopausées atteintes de cancer du sein et soumises à une stimulation de la fonction surrénalienne par ACTH. Nous avons supposé en effet que l'existence d'une relation entre la production des estrogènes surrénaliens et la présence d'une tumeur mammaire pourrait être vérifiée par cette stimulation de la fonction surrénalienne. Cinq femmes ménopausées présentant une tumeur mammaire ont reçu des injections de corticotrophine. Les estrogènes plasmatiques et urinaires ont été déterminés avant et après le test. Les résultats sont présentés dans le tableau V :

TABLEAU V

ESTROGENES TOTAUX PLASMATIQUES ET URINAIRES AVANT ET APRES ACTH.

Patient		Estrone	Estradiol	Estriol	Estrone + Estradiol	Estriol
		µg/100 ml de plasma			µg/24 h d'urines	
B	Avant	traces	traces	traces	10	5
	Après	0,02	traces	traces	20	5
L	Avant	0,01	0,02	0,02	15	5
	Après	traces	0,03	0,02	10	5
C	Avant	traces	0,02	0,02	40	5
	Après	traces	0,02	0,03	15	10
D	Avant	traces	0,03	0,05	5	5
	Après	traces	0,02	0,05	5	5
H	Avant	traces	0,03	0,075	15	5
	Après	traces	0,03	0,09	10	5

Totaux = libres + conjugués.

Les résultats ne montrent pas de différence significative avant et après le test pour aucun des estrogènes plasmatiques. Les taux urinaires ne présentent pas non plus de différence significative.

TSYRLINA et col. (1970) ont étudié de la même manière l'influence de la corticotrophine sur l'excrétion des stéroïdes neutres et phénoliques chez les femmes ménopausées atteintes ou non de cancer du sein. Les résultats de la stimulation étaient identiques chez les femmes normales et chez les malades, ceci faisant supposer aux auteurs l'absence d'influence par la tumeur du sein sur l'activité de la corticosurrénale après la ménopause. Nos propres résultats semblent confirmer cette hypothèse. Cette étude a fait ressortir par ailleurs la très faible importance de la production d'estrogène par la corticosurrénale.

b) Taux d'estrogènes dans des liquides de kyste

Ayant pu obtenir des liquides provenant de kystes ovariens ou mammaires ainsi qu'un liquide provenant de la ponction d'un corps jaune hémorragique, nous avons effectué le dosage des estrogènes dans ces différents liquides biologiques. Nous donnons les taux mesurés en ng par volume total du liquide pour chaque kyste, ce volume allant de 8 à 40 ml.

TABLEAU VI

ESTROGENES TOTAUX DANS DES LIQUIDES DE KYSTE
(en ng)

	Estrone	Estradiol	Estriol
Kyste ovarien	32 2 40 38 140 29 5	traces 5 120 traces 186 24 35	4 3 3 3 116 26 8
Kyste mammaire	30	15	21
Corps jaune hémorragique	3	9	4

2) Corps jaune cyclique et pseudo-gestatif

Les taux des estrogènes plasmatiques totaux ont été déterminés chez des femmes soumises à une épreuve de stimulation-freinage par HCG-Dexaméthasone. Cette épreuve, brièvement décrite ici, sera plus longuement étudiée dans la 3ème partie de cette thèse. Parmi les femmes soumises à cette épreuve, huit étaient parfaitement normales et constituaient des témoins; les taux plasmatiques d'estrogènes chez ces huit témoins ont également été déterminés au cours du cycle précédant l'épreuve de stimulation. Les autres femmes présentaient des troubles divers d'ordre gynécologique, stérilités primaire ou secondaire, aménorrhée, etc.

a) Estrogènes plasmatiques au cours de la phase lutéale normale

Les taux cités sont ceux trouvés au cours de la phase lutéale, au 5ème jour du décalage de la température; ils sont donnés en pg/ml de plasma :

- Estrone : 1160 ± 400 (540 - 1900)
- Estradiol : 400 ± 260 (220 - 880)
- Estriol : 460 ± 240 (200 - 1000)

Ces concentrations sont inférieures ou du même ordre de grandeur que celles trouvées dans la littérature (cf. tableau VII). ROY (1962) a appliqué sa technique à la détermination des estrogènes totaux dans le sang non centrifugé . Les taux trouvés dans ces conditions, tout en étant comparables aux nôtres, présentent une beaucoup plus grande dispersion (estriol, non détecté; estrone, 0-1400 pg/ml; estradiol, 0-300 pg/ml).

Il apparait donc que les améliorations que nous avons apportées à la technique de purification des extraits et à celle de fluorométrie ont permis d'augmenter la spécificité des déterminations.

b) Estrogènes plasmatiques après stimulation par HCG

L'épreuve de stimulation, telle qu'elle a été définie par JAYLE (1963), consiste en une administration de 15.000 UI de gonadotrophines chorioniques (HCG) pendant la phase lutéale en y associant la dexaméthasone pour freiner la production des cortico-surrénales. Après le 6ème jour de l'épreuve, le corps jaune cyclique devient pseudo-gestatif et on prélève alors le sang de la patiente. En même temps, une analyse des estrogènes urinaires est effectuée.

TABLEAU VII

TAUX DES ESTROGENES PLASMATIQUES TOTAUX CITES DANS LA LITTERATURE (pg/ml)

Auteurs	Méthode	Période du cycle	Estrone	Estradiol	Estriol
PREEDY 1957	Fluorométrie	Phase lutéale	600-2150	700	2960
OERTEL 1961	Fluorométrie	Cycle total	5000-15000	3000-8000	
KROMAN & col. 1964	CPG *	Cycle total	38000	8400-60700	
CEDARD 1965	Fluorométrie	Phase folliculaire Phase lutéale	700 ± 500 1400 ± 800	0 600 ± 500	
PANICUCCI & TAPONECO 1965	CPG *	Phase folliculaire Phase lutéale	5200-7300 5600-8000	1500 ± 400 2200 ± 400	
WOTIZ & col. 1967	CPG *	Cycle total	300-2600	170 - 6350	

* CPG = Chromatographie en phase gazeuse.

Ceux-ci nous ont permis de déterminer si la réponse à la stimulation était positive ou négative, les critères de réponse (JAYLE, 1963) étant les suivants :

Estrogènes urinaires	Réponse positive	Réponse négative
Estrone + Estradiol	25 à 40 µg/24 h	25 µg/24 h
Estriol	30 à 60 µg/24 h	30 µg/24 h

Une quinzaine de femmes, dont les huit témoins précédents ont subi le traitement cité. Les concentrations plasmatiques des estrogènes, déterminés le 6ème jour de l'épreuve, sont les suivantes :

Estrone : 3020 ± 1640 (660-5520)
Estradiol : 1240 ± 560 (480-2260)
Estriol : 1220 ± 620 (500-2680)

L'augmentation par rapport aux taux trouvés pendant un cycle normal est donc très significative; ces valeurs sont celles qui sont trouvées au début de la grossesse, ce qui confirme la transformation pseudo-gestative du corps jaune stimulé par HCG.

Les rapports estrone/estriol et estrone/estradiol sont identiques comme au cours de la phase lutéale et compris entre 2,4 et 2,9.

c) Corps jaune pseudo-gestatif

Plus de 80 femmes traitées pour une stérilité primaire ou secondaire, une aménorrhée, une spanioménorrhée, etc... ont été soumises au test de stimulation-freinage. Les estrogènes plasmatiques et urinaires ont été dosés au 6ème jour de l'épreuve. Quarante femmes ont répondu favorablement au test HCG; quarante quatre femmes n'ont pas répondu à la stimulation; les taux respectifs de ces deux groupes sont donnés dans le tableau suivant :

	Estradiol pg/ml	Estrone pg/ml	Estriol pg/ml
Réponse positive	1100 ± 690	3720 ± 900	1130 ± 630
Réponse négative	480 ± 110	1390 ± 340	400 ± 90

Il y a donc une différence significative entre les deux groupes de réponse. On a pu noter également une bonne corrélation entre l'excrétion urinaire et le taux plasmatique des estrogènes, le coefficient de corrélation mesuré r étant de 0,75.

CONCLUSION

Dans le domaine des estrogènes, les techniques de spectrophotométrie se révèlent, sur le plan quantitatif, d'un intérêt plus historique que pratique. Il peut être par contre intéressant d'étudier les spectres d'absorption dans les acides des nombreux dérivés des phénolstéroïdes lorsque l'identification de ceux-ci est concernée. En effet, ces substances ont très souvent un comportement très caractéristique dans l'une ou l'autre des conditions que nous avons exposées.

Sur le plan quantitatif, la réaction d'Ittrich qui a été pendant longtemps la technique de référence pour la détermination des estrogènes, nous a permis de mesurer les taux d'estrone, d'estradiol et d'estriol plasmatiques chez des femmes témoins et chez de nombreuses patientes dont la plupart souffraient d'hypogonadisme. La fonction ovarienne a été explorée chez ces femmes par l'étude des taux d'estrogènes avant et après stimulation par des gonadotrophines chorioniques et il a été possible de déterminer une différence significative entre les deux groupes de résultats.

Il est apparu au cours de ces déterminations que la limite de sensibilité de la méthode fluorométrique était un obstacle à l'étude de taux très faibles d'estrogènes et, en particulier, qu'il était impossible de déterminer par cette technique les taux d'estrogènes libres du plasma, soit au cours du cycle, soit au début de la grossesse. C'est ainsi que nous avons été amenés à aborder des techniques plus sensibles telles que la chromatographie gazeuse ou les radiodosages. En particulier, la technique de radioimmunocompétition que nous développons dans la partie suivante de notre exposé nous a permis de contribuer à la connaissance des fonctions ovarienne et placentaire chez la femme et chez la ratte par la détermination des taux d'estrogènes dans le sang des veines périphériques ovarienne ou placentaire.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE RADIOIMMUNOLOGIQUE

La technique radioimmunologique a été définie pour la première fois par BERSON et YALOW (1959). Elle s'intègre aux techniques analytiques de saturation dont le principe est le suivant : un ligant marqué L* (hormone par exemple) est mis en compétition pour un nombre limité de sites de liaison sur une protéine spécifique P, avec des quantités variées de ligant non marqué L. Il se forme un équilibre qui est caractérisé par les quantités de substance liée et libre.

$$\left\{ \begin{matrix} L \\ \\ L^* \end{matrix} \right\} + P \rightleftharpoons \left\{ P \begin{matrix} L \\ \diagdown \\ L^* \end{matrix} \right\} + \left\{ \begin{matrix} L \\ \\ L^* \end{matrix} \right\}$$

L'addition de ligant non marqué va déplacer la radioactivité liée en fonction de la quantité ajoutée. La quantité de radioactivité présente dans le complexe est donc fonction de la quantité de substance froide. En déterminant la répartition de la radioactivité dans les deux fractions liée et non liée à la protéine, il est donc possible de calculer la masse du ligant dans un échantillon inconnu.

Dans le cas de radioimmunodosages, la fraction protéique spécifique de liaison est un anticorps obtenu par immunisation d'animaux, l'antigène est formé par couplage d'un stéroïde avec une protéine. Les albumines sériques bovine (BSA) ou humaine (HSA) sont couramment utilisées dans le domaine des stéroïdes.

Le couplage de la protéine et du stéroïde se fait au niveau des groupements aminés de la protéine d'une part et d'une fonction

oxygénée du stéroïde d'autre part. L'haptène servant au couplage est généralement un dérivé du stéroïde. Pour les estrogènes, il s'agit le plus souvent de succinates en C_3, C_{16} et (ou) C_{17}. Depuis une douzaine de mois cependant, de nombreux auteurs ont choisi comme haptènes des dérivés formés en une fonction éloignée des fonctions caractéristiques de la molécule d'estrogène, augmentant ainsi de façon considérable la spécificité des anticorps obtenus (6-O((carboxyméthyl))oxime, 2- ou 4-azobenzoate) . Le tableau IX est une récapitulation des différents antigènes préparés par les auteurs en vue d'obtenir des immunsérums anti-estrogènes.

Les différentes techniques de radioimmunodosage décrites dans la littérature se distinguent surtout par la méthode de séparation des fractions liée et non liée à l'anticorps. Cette séparation peut être effectuée de quatre manières :

- le système à phase solide, décrit et utilisé par ABRAHAM(1969), ABRAHAM et ODELL (1970), EXLEY (1971), JEFFCOATE et col.(1972), est un système dans lequel les protéines de l'antisérum sont préalablement fixées sur les parois d'un tube en polystyrène. Par incubation avec les stéroïdes marqué et non marqué, ceux-ci se lient en partie aux anticorps et s'accrochent donc aussi aux parois du tube. La détermination de la radioactivité restant en solution permet de déduire le pourcentage de stéroïde fixé aux protéines. Ce procédé d'adsorption sur le polystyrène est affecté par le pH et la molarité de la solution ainsi que par la température de réaction.-

- Le système du double anticorps a été décrit par MIDGLEY et col.(1969) et par NISWENDER (1969). La séparation des fractions libre et liée à l'anticorps obtenu chez un lapin se fait par précipitation du complexe gammaglobuline par un antisérum anti-gammaglobuline de lapin, c'est-à-dire, précipitation du stéroïde lié à l'anticorps spécifique par un deuxième anticorps. Cette séparation, présente l'inconvénient de requérir de longues périodes d'incubation (5jours au total).

- Le système de l'anticorps polymérisé utilisé par DONINI et col.(1968), MIKHAIL et col.(1970), MOORE et col.(1972) implique la polymérisation de l'anticorps par un agent polymérisant tel le glutaraldéhyde ou l'éthylchloroformate et sa conservation sous forme de suspension à 4°C. L'incubation des extraits de stéroïde est réalisée avec cette suspension, puis les fractions libre et liée sont séparées par simple centrifugation et décantation. Cette technique, simple et rapide présente le seul inconvénient de nécessiter une étape d'ultracentrifugation.

- Le système d'adsorption, enfin, est couramment utilisé : un adsorbant est ajouté au milieu d'incubation soit au début, soit à la fin de la réaction. Cet adsorbant peut être soit le florisil (TILLSON, 1970), le dowex chloré (JIANG et RYAN, 1969) soit, surtout une suspension de charbon dextran (JIANG et RYAN, 1969, WU et col., 1971, LINDNER et col., 1972, TULCHINSKY et col., 1971...). La fraction liée à la protéine reste dans le surnageant et peut être facilement séparée,par centrifugation,de la fraction libre adsorbée.

La deuxième partie de cette thèse concerne spécialement ce domaine de radioimmunologie qui, par la suite, nous a permis d'aborder des problèmes physiologiques.

Nos premiers essais de radiodosage des estrogènes ont été effectués grâce à B.V. CALDWELL qui a bien voulu nous donner un immunsérum anti-estradiol de haute activité. Plusieurs chercheurs de notre équipe ont ultérieurement préparé un immunsérum de haute spécificité vis-à-vis de l'estradiol (DRAY et col., 1971). Afin de disposer d'une gamme plus complète d'immunsérums en vue de notre étude ultérieure, nous nous sommes, pour notre part, consacrés plus spécialement à la préparation d'un immunsérum anti-estriol spécifique, avec la collaboration du Docteur ROMBAUTS et les conseils du Docteur DRAY.

Ce travail comprend trois parties : la première concerne essentiellement la synthèse de l'antigène, dérivé de l'estriol couplé à la BSA et l'immunisation de différentes espèces animales avec cet antigène; la deuxième partie est une étude critique de la technique

de radioimmunodosage utilisée ainsi que des techniques d'extraction et de purification des stéroïdes provenant de différents fluides biologiques; la troisième partie, enfin, discute des différentes qualités des immunsérums obtenus chez plusieurs animaux, en se référant aux immunsérums décrits dans la littérature.

TABLEAU IX

ANTIGENES DECRITS POUR LES ESTROGENES

Auteur	Espèce immunisée	Conjugué utilisé
Goodfriend et Sehon-1958, 1960, 1961_a et 1961_b Goodfriend et col. 1961 Goodfriend et Sehon- 1970	Lapin	Estrone-2- ou -17-carbamido-BSA
Lieberman et col. - 1959 Beiser et col. - 1959	Lapin	Estrone-17-CMO-BSA
Niswender et Midgley,1970	Lapin	Estrone-17-CMO-BSA
Jeffcoate - 1971	Cobaye	Estrone-17-BSA
Sprunt et col.- 1951	Lapin	Estradiol-17β-albumine
Ferin et col.-1968	Brebis	Estradiol-17β-succinyl-BSA
Gross et col.-1968 Gross - 1970	Lapin	Estradiol-17β-2- (ou-4) azobenzoyl-BSA ou -KLH
Jiang et Ryan - 1969	Lapin	Estradiol-17β-succinyl-BSA
Midgley et col.-1969	Lapin	Estradiol-17-formyl-BSA
Niswender et Midgley-1970	Lapin	Estradiol-17β-chloro-carbonate ou estradiol-3-hémisuccinate-BSA ou RSA
Thorneycroft et col.-1970	Lapin-Brebis	Estradiol-17β-succinyl-BSA ou estradiol-3-succinyl-BSA
Abraham - 1970_1	Lapin-Brebis	Estradiol-3 ou 17β-hémi-succinate-BSA
Mikhail - 1970_1	Brebis	Estradiol-17β-hémi-succinate-BSA
Dray et col. 1971	Lapin-Brebis	Estradiol-6-CMO-BSA
Wagner - 1971 Van de Wiele et col.-1971	Brebis	Estradiol-17β-succinate-BSA
Exley-1971, Dean-1971 Exley-1972, Lindner-1972	Lapin	Estradiol-6-CMO-BSA
Jeffcoate-1972	Cobaye	Estradiol-6-CMO-BSA

TABLEAU IX (Suite)

Auteur	Espèce immunisée	Conjugué utilisé
Gross-1970, Gross-1971	Lapin	Estriol-4-azobenzoyl-KLH ou -BSA
Gurpide et col.-1971	Brebis	Estriol-16,17-disuccinate-BSA
Tulchinsky et col.-1971	Brebis	Estriol-3-monosuccinate- ou -trisuccinate-BSA
Lindner-1972 de Lauzon et col.-1972	Lapin Lapin-Brebis	Estriol-6-CMO-BSA
Wilson-1972	Brebis	Estriol-16,17-dihémi-succinate-BSA

Abréviations

CMO=O-(carboxyméthyl)oxime; BSA=Bovine serum albumin
HSA = human serum albumin ; RSA = Rabbit serum albumin
KLH = keyhole limpet hemocyanin.

CHAPITRE I

PREPARATION D'UN IMMUNSERUM ANTIESTRIOL

Le choix du dérivé utilisé pour le couplage d'un stéroïde à une protéine se révèle être de plus en plus le problème majeur, parmi ceux soulevés par la préparation d'un immunsérum antistéroïde spécifique. Un immunsérum antiestradiol a été préparé en partie dans notre laboratoire, à partir de 6-carboxyméthyloxime-estradiol (DRAY et col. 1971). L'activité très satisfaisante de cet immunsérum et surtout sa très haute spécificité par rapport aux autres immunsérums antiestradiol décrits alors, nous a conduits tout naturellement à suivre le même processus pour préparer l'immunsérum antiestriol spécifique que nous recherchions. La préparation de l'antigène 6-carboxyméthyl oxime estriol-BSA à partir d'estriol implique les synthèses intermédiaires de 6-oxo-estriol et de 6-carboxyméthyloxime-estriol (6-CMO), puis le couplage de l'haptène ainsi obtenu à la BSA.

A) - MATERIEL

- L'estriol provient de Roussel UCLAF.
- La pyridine, Prolabo, est redistillée avantusage.
- L'anhydride acétique, l'anhydride chromique, la potasse sont également des produits Prolabo RP.
- Les solvants organiques sont des produits Merck pour analyse; le dioxane Merck est débarrassé des aldéhydes par passage sur colonne d'alumine basique Woelm.
- L'hydrochlorure de carboxyméthoxylamine provient de Aldrich Organic Chemicals.
- Le carbodiimide (1-éthyl-3(diméthylaminopropyl)carbodiimide) provient de Cyclochemical, Los Angeles, Californie.
- La BSA (cristalbumine sérique de boeuf) provient de Behringwerke (AG-Marburg Lahn-Allemagne).
- La 2-méthoxy,5-nitrotropone (MNT) provient de Sankyo co-LTD, Tokyo-Japon.

- Les points de fusion, non corrigés, ont été mesurés sur un bloc Kofter-Reichter.
- L'analyse élémentaire des produits synthétisés a été effectuée par le Service Central de Microanalyse du CNRS (94 - Thiais).
- Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Zeiss à 0,01° (raie D) du sodium).
- La spectrométrie infra-rouge a été réalisée sur un spectromètre Perkin-Elmer, modèle 257.
- Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectrophotomètre UV Carl Zeiss M 4 Q III.
- La spectrométrie de masse, associée à la chromatographie en phase gazeuse, a été réalisée par G. Maume et B.F. Maume dans le Laboratoire du Professeur Padieu (Département de Biochimie, Université de Dijon). L'appareil utilisé était un LKB 9000. L'introduction des échantillons a été effectuée par chromatographie gazeuse (colonne de 2 m, OV 17, 1 %). L'énergie d'ionisation était de 70 ev, le courant de filament de 60 µA et la température de source de 270°C. Les échantillons ont été analysés après formation de dérivés triméthylsilyl éthers pour les fonctions OH et méthoximes pour la fonction cétonique.
- Les spectres de RMN ont été enregistrés dans le Laboratoire du Professeur Fétizon par Y. Henry sur un appareil GEOL C 60 H.

La fréquence utilisée était de 60MHz. Les déplacements chimiques notés à partir de la raie du tétraméthylsilane prise comme zéro de référence, sont exprimés en ppm et les constantes de couplage en hertz. Le solvant employé est le diméthylsulfoxyde deutérié DMSO (D_6).

B) - SYNTHESE DE L'ANTIGENE

Le processus de cette synthèse est schématisé dans les Figures 11 et 12.

I) SYNTHESE DU 6-OXO-ESTRIOL

L'estriol est tout d'abord acétylé afin de protéger les fonctions OH de la molécule lors de l'oxydation. Après oxydation sélective en position 6 selon le procédé décrit par LONGWELL et WINTERSTEINER (1940), le 6-oxo-estriol est obtenu par désacétylation.

1) Triacétate d'estriol

L'estriol (10 g) est dissous dans de la pyridine (150 ml) puis acétylé par 300 ml d'anhydride acétique pendant 12 heures à la température ambiante. Le mélange est évaporé jusqu'à 5 à 10 % du volume initial. La précipitation de l'acétate se fait par addition lente de 500 ml d'eau en refroidissant le mélange dans la glace. La précipitation est complète après 12 heures à 4°C. Le précipité est filtré et l'acétate est recristallisé dans l'éthanol (F 126-128°C; littérature, 126°C). Le rendement en acétate est de 96 %.

2) Triacétate du 6-oxo-estriol

Le triacétate d'estriol est dissous dans l'acide acétique à raison de 3,5 ml par gramme de stéroïde. La réaction d'oxydation est réalisée par addition d'anhydride chromique en solution dans un mélange eau/acide acétique (1/7) et par contact pendant 24 heures à la température ambiante. Après la réaction, l'excès d'anhydride chromique est détruit par l'éthanol. Le mélange est dilué par de l'eau et l'extraction du stéroïde est effectuée par l'éther. Après lavage de la phase éthérée par une solution aqueuse de carbonate saturée de bicarbonate, puis par l'eau, celle-ci est évaporée à sec. Il reste un liquide huileux. On traite ce dernier par le réactif de Girard (1 g par gramme d'acétate d'estriol de départ) après l'avoir remis en solution dans de l'éthanol et de l'acide acétique (respectivement 10 et 1 ml par gramme de réactif de Girard). Le mélange est mis à reflux pendant une heure puis dilué par de l'eau (50 ml par gramme de réactif de Girard) et extrait quatre fois par un même

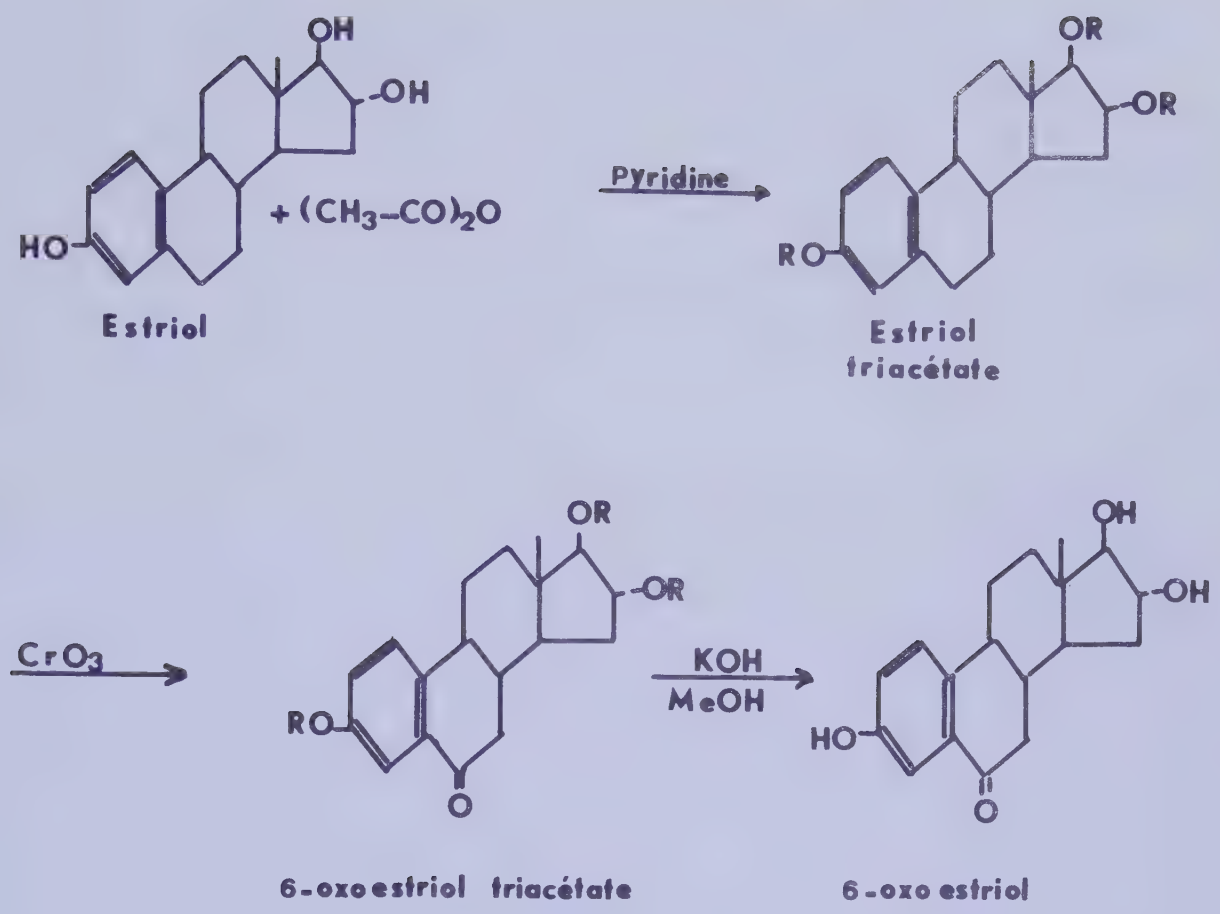


Fig.11 Schéma de synthèse de l'haptène

volume d'éther. Les produits non cétoniques, extraits par l'éther, sont ainsi séparés de l'acétate du 6-oxo-estriol resté dans la phase aqueuse. On récupère ce dernier par hydrolyse : la phase aqueuse est acidifiée par l'acide chlorhydrique jusqu'à normalité. La précipitation de l'acétate se fait à la température ambiante durant 12 heures. L'acétate est alors filtré, lavé par de l'eau et séché sous vide. On obtient ainsi un mélange des mono-, di-, et triacétates du 6-oxo-estriol.

3) 6-oxo-estriol

La désacétylation des acétates est effectuée par action de la potasse en solution méthanolique (20 %, p/v) à raison de 2 ml pour 100 g d'acétate. La réaction se fait pendant 24 heures à température ambiante sous atmosphère d'azote. Le stéroïde cristallise lorsque le mélange est ensuite dilué puis acidifié par de l'acide chlorhydrique.

Le rendement de la synthèse à cette étape est de 8 % par rapport à l'estriol de départ.

4) Identification du dérivé obtenu

- Le point de fusion du dérivé obtenu est 238-241°C (Litt. 240°C pour le 6-oxo-estriol-MARRIAN 1960).
- Les résultats de l'analyse élémentaire et de la mesure de pouvoir rotatoire sont présentés dans le tableau X et sont conformes aux résultats attendus.
- Le spectre d'absorption dans l'UV en solution éthanolique présente un maximum à 255 nm avec un coefficient d'extinction molaire $\varepsilon = 8{,}05.10^{3} M^{-1} cm^{-1}$.
- Le 6-oxo-estriol a été chromatographié sur plaque de gel de silice dans les systèmes -acétate d'éthyle 100 % -, -acétate d'éthyle/cyclohexane 70/30 - et -dichlorométhane/méthanol 50/50; les Rf dans ces trois systèmes sont respectivement de 0,16-0,08 et 1.
- Le spectre infra-rouge réalisé à partir d'une pastille de bromure de potassium contenant 2 mg de stéroïde, a permis de distinguer, outre les bandes caractéristiques de la plupart des estrogènes,

TABLEAU X

CONSTANTES PHYSIQUES DES INTERMEDIAIRES DE LA SYNTHESE DE L'ANTIGENE

	ESTRIOL $C_{18}H_{24}O_3$	6-OXO-ESTRIOL $C_{18}H_{22}O_4$		6-CMO-ESTRIOL $C_{20}H_{25}O_6$	
P M	288,4	302,4		375,4	
P F	275-277°C	238-241°C		225°C (décomp.)	
$(\alpha)_D^{20°}$	+ 55° (0,4% dioxane)	-3° (1% éthanol)		-31 (1 % éthanol)	
Analyse élémentaire		Calculé %	Trouvé %	Calculé %	Trouvé %
C		71,50	70,38	63,98	63,22
H		7,33	7,15	6,71	6,81
N				3,73	3,78
O				25,57	26,20
Spectre UV λ max (ε)		255 nm($8,05.10^3 M^{-1}cm^{-1}$)		260 nm($10,66.10^3 M^{-1}cm^{-1}$)	

une bande de vibration de valence à 1680 cm^{-1} et correspondant à l'absorption d'un carbonyl cétonique insaturé αβ cyclique conjugué et qui peut, selon toute vraisemblance, être attribuée à la fonction cétone du 6-oxo-estriol.

- La chromatographie en phase gazeuse a permis de confirmer la pureté du dérivé par la présence d'un seul pic après transformation du 6-oxo-estriol en son dérivé O-méthyloxime triméthylsilyl (MO-TMSi) par action du chlorhydrate de méthoxylamine dans la pyridine, puis du bis-triméthylsilyl-trifluoro acétamide.

- Spectrométrie de masse - Le dérivé O-méthyloxime triméthylsilyl du 6-oxo-estriol a donné un spectre de masse caractéristique avec :

un pic moléculaire M^+ à	m/e = 547	(PM calculé = 547)
et des pics à	m/e = 532	M-15 perte du méthyl angulaire
	m/e = 516	M-31 perte du OCH_3 confirmée par
un pic métastable à	m/e = 487	($516^2/547 = 487$)
enfin, un pic à	m/e = 426	M-90-31 perte du fragment $HO\text{-}Si(CH_3)3$

- Spectre RMN $[(CD_3)_2SO]$

Le spectre, tout d'abord étudié dans le DMSO, est ensuite enregistré dans l'eau deutériée.

L'identité du 6-oxo-estriol est confirmée par la présence de pics correspondants aux protons du groupement méthyl, du noyau aromatique et des fonctions hydroxyle (cf. tableau XI).

II) - SYNTHESE DU 6-O(CARBOXYMETHYL)OXIME DE L'ESTRIOL

L'action du chlorhydrate de l'O-carboxyméthoxylamine sur la fonction cétonique du 6-oxo-estriol s'effectue en présence d'une base. Cette dernière peut être soit la pyridine, soit la soude. Les deux procédés ont été essayés successivement.

1) Réaction en présence de pyridine

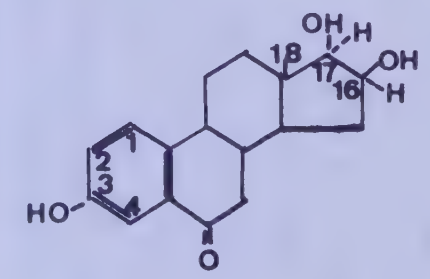
Le 6-oxo-estriol (100 mg) est dissous dans la pyridine (10 ml) puis additionné d'une même quantité de carboxyméthylhydroxylamine. Le mélange est laissé dans une étuve à 60°C pendant 45 minutes. Le solvant est ensuite évaporé à sec et le stéroïde est cristallisé dans le mélange chloroforme/acétone.

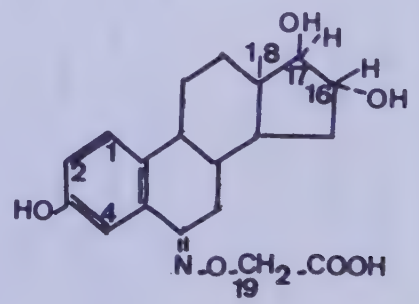
TABLEAU XI

DONNEES DES SPECTRES RMN DES DERIVES 6-OXO-ESTRIOL ET 6-CMO-ESTRIOL

6-OXO-ESTRIOL					6-CMO-ESTRIOL				
Déplacement ppm	Nombre de protons	Nature du pic	Proton	Après deutériation	Déplacement ppm	Nombre de protons	Nature du pic	Proton	Après deutériation
0,68	3 H	s	en C_{18}	présent	0,68	3 H	s	C_{18}	présent
3,47	2 H	s élargi	en C_3 en $C_{17\alpha}$	1 H, d en $C_{17\alpha}$	3,35	1 H	s élargi	$C_{17\alpha}$	présent
3,9	1 H	s élargi	en 16_β	présent	3,9	1 H	s élargi	$C_{16\beta}$	pic D_2O
4,8	2 H	m	en 16α et 17β	absents	4,72	2 H	s	C_{19}	présent
7,25	3 H	m	en C_1,C_2 et C_4	présent	7,3	3 H	m	C_1,C_2 et C_4	présent

s = singulet; d = doublet; m = multiplet





2) Réaction en milieu sodique

Le 6-oxo-estriol (100 mg) est dissous dans l'éthanol (20 ml) puis additionné d'un léger excès, en poids, de carboxyméthyl-hydroxylamine. Le mélange est mis à reflux pendant 2 heures après addition de 4 ml de soude à 5 % dans l'eau. Le dérivé formé est extrait de la solution acidifiée par l'éther. Celui-ci est lavé à l'eau puis évaporé à sec. Le résidu est cristallisé dans le mélange chloroforme/acétone.

3) Identification du dérivé obtenu

La pureté des dérivés obtenus par les deux procédés a été vérifiée par chromatographie sur couche mince. Les cristaux obtenus par la première technique sont hétérogènes et donnent plusieurs taches sur couche mince. Par contre, la deuxième technique, en milieu sodique, donne un seul composé, avec un rendement de synthèse de 95 %. Tous les moyens d'identification décrits ci-dessous ont été utilisés uniquement pour le dérivé obtenu par cette dernière technique.

- Le point de fusion du dérivé est 225°C, avec décomposition.
- L'analyse élémentaire est conforme aux résultats calculés (cf. tableau X).
- La chromatographie sur couche mince de gel de silice (système : dichlorométhane/méthanol 50/50) a permis de différencier le 6-oxo-estriol (Rf = 1) du 6-CMO-estriol (Rf = 0,73).
- De même, le spectre d'absorption dans l'UV, obtenu dans l'alcool met en évidence un déplacement de 5 nm pour le maximum du 6-CMO-estriol par rapport à celui du 6-oxo-estriol (λ max. du 6-CMO-estriol = 260 nm, $\varepsilon = 10{,}66.10^{-3}\ M^{-1}cm^{-1}$).

Le spectre infra-rouge, réalisé dans les mêmes conditions que celui du 6-oxo-estriol montre surtout par rapport à ce dernier, la disparition de la bande de vibration de valence à 1680 cm^{-1} et qui correspondait à l'absorption d'une cétone conjuguée; par contre, il est possible de noter l'apparition d'une bande d'absorption à 1710 cm^{-1} très caractéristique d'un carbonyl carboxylique.

- L'étude de chromatographie gazeuse associée à la spectrométrie de masse a été réalisée avec le dérivé triméthylsilyl du 6-CMO-estriol (éther de triméthylsilyl en 3, 16 et 17, et ester de triméthylsilyl sur le carboxyl de la molécule) par action du bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide. Le composé ainsi formé n'a donné qu'un seul pic en chromatographie gazeuse. Le spectre de masse comporte un pic moléculaire (M^+ à m/e = 663, PM calculé = 663) et des fragments caractéristiques de la structure supposée pour le 6-CMO-estriol. Les pics caractéristiques des deux dérivés sont comparés dans le tableau XII.

- Le spectre de RMN $\left[(CD_3)_2SO\right]$ apporte une confirmation supplémentaire de l'identité du 6-CMO-estriol; il est en effet possible de noter l'apparition des deux protons du groupement carboxyméthyloxime N-O-CH_2-COOH par rapport au spectre du 6-oxo-estriol, ces deux protons ne disparaissant pas après deutériation (tableau XI).

III) - CONJUGAISON DU 6-CMO-ESTRIOL A LA CRISTALBUMINE BOVINE

L'immunogène utilisé pour l'immunisation des animaux est obtenu par couplage de l'haptène stéroïdique à une protéine de haut poids moléculaire, telle l'albumine sérique de boeuf (BSA). Cette conjugaison implique la présence d'une fonction oxygénée (hydroxyl ou cétone) à la position où l'on désire opérer le couplage. Le 6-CMO-estriol formé possèdant une fonction cétone, la réaction peut être effectuée soit par l'intermédiaire d'un anhydride mixte (ERLANGER, 1957), soit par l'action du carbodiimide (ABRAHAM, 1971). Nous avons comparé ces deux voies.

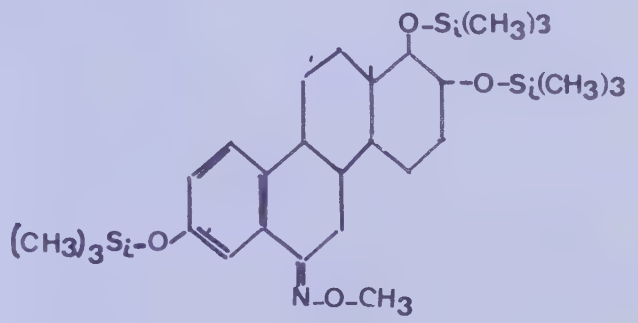
1) Technique utilisant la carbodiimide

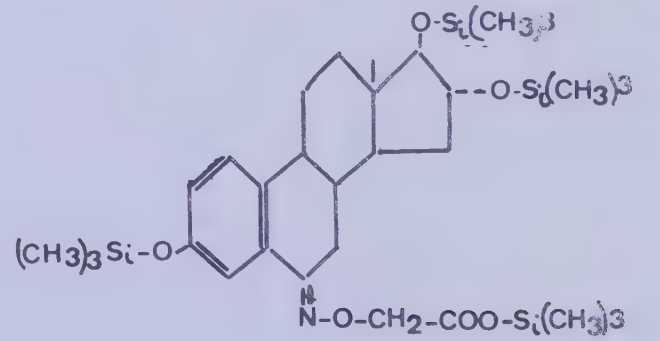
Le stéroïde (4 mg) est dissous dans une solution aqueuse d'éthanol (10 %) et de carbonate (0,02 %). Le pH est ajusté à 5,5. La BSA (8 mg) est alors ajoutée, puis la carbodiimide (4 mg). Le pH est ajusté à 5,5 après l'addition de chaque réactif. Le mélange est laissé 24 heures à température ambiante. La solution est ensuite

TABLEAU XII

DONNEES DES SPECTRES DE MASSE DES 6-OXO-ESTRIOL ET 6-CMO-ESTRIOL

6-OXO-ESTRIOL			6-CMO-ESTRIOL		
m/e		Fragmentation	m/e		Fragmentation
547	M^+	Pic moléculaire	663	M^+	Pic moléculaire
532	M-15	18-CH_3	517	M-146	
516	M-31	O-CH_3	516	M-147	$OCH_2COOSi(CH_3)_3$
426	M-90-31	$HOSi(CH_3)_3$	426	M-147-90	$HOSi(CH_3)_3$
			400	M-263	
			336	M-147-2(90)	2 $[HOSi(CH_3)_3]$





dialysée durant quatre jours contre un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,45 contenant 0,15 M de NaCl. Après lyophilisation, l'antigène est prêt pour l'immunisation.

2) Technique de l'anhydride mixte (Figure 12).

Le 6-CMO-estriol (150 mg) est dissous dans le dioxane (4 ml) en présence de 0,1 ml de tri-n-butylamine. La solution refroidie à 10°C est additionnée d'isobutylchlorocarbonate (0,055 ml) puis laissée 20 minutes à 4°C sous agitation permanente. Le mélange est alors versé dans une solution à 4°C de BSA (préparée par dissolution de 540 mg de BSA dans 15 ml d'eau, refroidie à 4°C et additionnée d'un mélange de 15 ml de dioxane et 0,57 ml de soude N). La préparation ainsi obtenue est agitée une heure à 4°C puis additionnée de 0,015 ml de soude N. Le pH, alors proche de 8,4 est ajusté à 9,5 par de la soude N. Après un nouveau contact de une heure à 4°C sous agitation magnétique, la solution d'antigène est dialysée contre de l'eau distillée (renouvelée chaque jour) pendant quatre jours. Le dialysat est transvasé dans un bécher; l'antigène est précipité à pH 4,5 par addition d'acide chlorhydrique dilué (la précipitation est complète après 48 heures). Après centrifugation à 4°C, le précipité est dissous dans un minimum d'eau (la dissolution est facilitée par addition d'une pincée de bicarbonate). Cette dernière solution est lyophilisée.

3) Détermination du nombre de résidus de stéroïde par molécule de protéine.

Cette détermination peut se faire selon deux processus : mesure du nombre de groupements aminés libres restant sur la protéine après couplage de l'haptène ou mesure, par absorption UV de l'antigène, du nombre de molécules d'haptène fixées par molécule de BSA.

a) Détermination du nombre de radicaux aminés libres

La méthode décrite par TAMAOKI et col. (1967) est basée sur la réaction spécifique de la 2-méthoxy-5-nitrotropone avec les

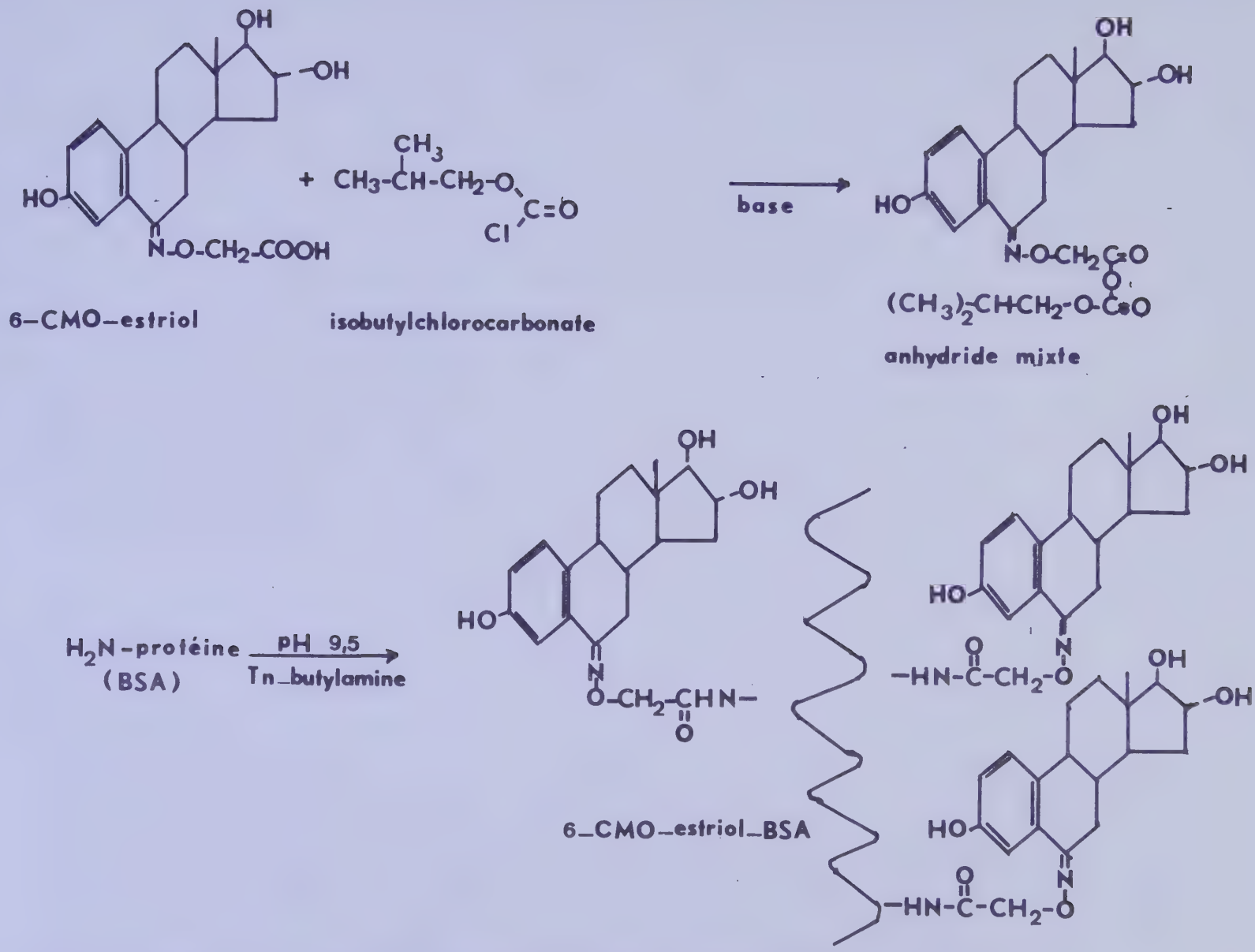
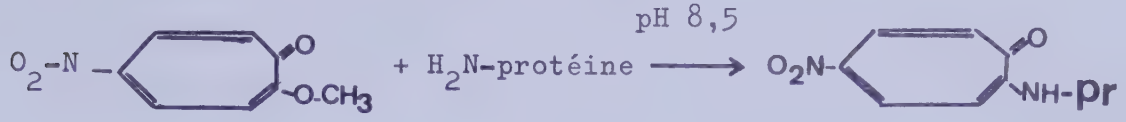


Fig.12 Schéma de couplage de l'haptène à la BSA (méthode de l'anhydride mixte)

groupements aminés libres d'une protéine, en milieu aqueux légèrement alcalin, suivant le schéma :



2-méthoxy-5-nitrotropone (MNT)

résidu nitrotroponyl

Le produit obtenu, de coloration orange présente une forte bande d'absorption à 420 mμ et permet donc ainsi l'appréciation du nombre de groupements aminés bloqués par la MNT.

La MNT est dissoute dans la diméthylformamide (10 mg/ml) et ajoutée à l'antigène (4 mg), lui-même dissous dans du tampon phosphate 0,3 M - pH 8,5 (0,6 ml). Le mélange est dilué par addition de 1,22 ml d'eau distillée puis laissé 3 heures à la température ambiante à l'abri de la lumière. L'excès de réactif est éliminé par dialyse jusqu'à disparition de toute coloration jaune. La densité optique est mesurée sur une aliquote. La concentration en radicaux NH_2 est alors obtenue à partir du coefficient d'extinction molaire de la lysine conjuguée à la MNT ($\varepsilon M = 2,07.10^4 M^{-1} cm^{-1}$).

Connaissant ainsi le nombre de groupements NH_2 libres par molécule de BSA avant et après couplage à l'haptène, le nombre de résidus d'haptène fixés par molécule de BSA peut facilement être déduit.

b) Concentration du stéroïde dans l'antigène par absorption UV

. Connaissant le coefficient d'extinction molaire du 6-CMO-estriol ($10,66.10^3 M^{-1} cm^{-1}$ à 260 nm), il est possible de déterminer la concentration molaire de l'haptène dans l'antigène en mesurant la densité optique à 260 nm. A cette longueur d'onde, la contribution de la BSA est minime et peut être facilement soustraite.

Une solution d'antigène est préparée dans l'eau à 1 % d'éthanol.

La concentration en protéines de cette solution est déterminée par la réaction de LOWRY (1951). Par ailleurs, la densité optique de la solution est mesurée au maximum d'absorption de l'haptène. L'absorbance de la BSA à la même longueur d'onde et à la même concentration que celle présente dans l'antigène est également mesurée. L'absorbance dûe au stéroïde pur est alors déduite facilement. Connaissant ainsi les concentrations respectives de la BSA et du carboxyméthyloxime dans l'antigène, le nombre de résidus de stéroïdes fixés sur les 60 groupements aminés de la molécule de BSA est calculé.

c) Résultats

Le nombre de résidus de stéroïde fixés par molécule de BSA pour les antigènes obtenus par les deux modes de couplage a été mesuré par les procédés qui viennent d'être décrits. Les chiffres obtenus sont analogues quelle que soit la méthode d'évaluation.

Le couplage stéroïde-protéine par l'intermédiaire de la carbodiimide a donné un antigène ayant 6 résidus seulement de stéroïde par molécule de BSA.

Par contre, l'antigène obtenu par la réaction de l'anhydride mixte contient 29 moles de stéroïde par molécule de protéine, c'est-à-dire que 50 % des groupements NH_2 libres de la molécule de BSA sont occupés par l'haptène. C'est ce dernier antigène qui a été utilisé pour l'immunisation des animaux.

C) - PROCESSUS D'IMMUNISATION

L'immunisation a été réalisée à Jouy-en-Josas (CNRZ) par le Docteur Rombauts sur deux espèces animales : deux brebis d'une part, sept lapines de race New Zealand, d'autre part. Pour ces dernières, deux techniques ont été essayées.

1ère technique d'immunisation

Cette technique, utilisée couramment, a été décrite notamment par ZIMMERING et col. (1967). L'antigène est dissous, à raison de 3 mg pour chaque brebis et 1 mg pour chaque lapine, dans 1 ml d'une solution de sérum physiologique et d'adjuvant complet de Freund (50/50). Le mélange intime de l'antigène dissous et d'une huile

minérale associée à la présence de mycobactéries réalise une émulsion de haut pouvoir antigénique.

Cette émulsion est injectée par voie sous-cutanée en 3 ou 4 points du corps. Les injections sont répétées une fois par semaine pendant toute la durée de l'immunisation.

Les brebis B 2038 et B 4394 ainsi que les lapines L 1258, L 1244, L 1277 et L 1278 ont été immunisées de cette façon.

2ème technique d'immunisation

Cette technique décrite par VAITUKAITIS et col. (1971) a été utilisée pour l'immunisation des lapines L 8393, L 8398 et L 8401.

1 mg d'antigène par lapine est émulsifié dans 2 ml d'un mélange de sérum physiologique et d'adjuvant de Freund (50/50), auquel ont été ajoutés 5 mg de bacille de Koch et 0,5 ml de vaccin anticoquelucheux. Cette émulsion est répartie en une cinquantaine d'injections intradermiques. Le processus d'immunisation est ainsi déclenché par cette unique administration d'antigène et deux rappels à respectivement 8 et 20 semaines du début de l'immunisation.

Dans les deux procédés d'immunisation, les sérums ont été prélevés pour le contrôle de l'apparition des anticorps et du titre des immunsérums en anticorps tous les huit ou quinze jours. Le prélèvement final a eu lieu vers la 30ème semaine d'immunisation.

CHAPITRE II

TECHNIQUES D'EXTRACTION, DE PURIFICATION ET DE DOSAGE DES STEROIDES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

La physiologie du corps jaune et du placenta chez les mammifères a été abordée dans ce travail sous un angle particulier qui implique la détermination de quelques stéroïdes, à la fois dans les urines, dans le sang et même,lorsqu'il s'agit des animaux, dans le liquide amniotique.

Ce chapitre comprendra donc, outre un bref rappel des techniques de dosage du prégnandiol et des estrogènes totaux urinaires, telles qu'elles sont appliquées en routine dans le laboratoire, une étude plus détaillée des méthodes que nous avons utilisées.

- pour la progestérone plasmatique et urinaire d'une part,
- pour les estrogènes libres urinaires et plasmatiques d'autre part.

A) - MATERIEL

I) ESTROGENES TOTAUX ET PREGNANDIOL URINAIRES

- H_2SO_4 pur Analar (BDH)
- p. nitrophénol et hydroquinone, purs (Merck)
- pyridine et triméthylchlorosilane (Pierce Chemical Company)
- suc d'Hélix pomatia, contenant 100.000 unités Fishman de β-glucuronidase et 1.000.000 d'unités Roy de sulfatase par ml (Industrie Biologique Française, Gennevilliers)
- pregnandiol et cholestérol (Merck)
- épicoprostanol (Steraloïds, Inc.)
- fluoromètre Farrand, type "Ratio Fluorometer" (Jouan, distributeur) équipé d'une lampe spectrale à vapeurs de thallium (Osram) et d'un filtre interférentiel secondaire à 564 nm (Schott)

- chromatographes à phase gazeuse :
  - o Giravion-Dorand, modèle Girdel 75, à détecteur à ionisation de flammes, équipé d'une colonne pyrex de 2m, 1/8", remplie de OV_1 à 2 % sur Gas Chrom Q 100-120 mesh (prégnandiol)
  - o Perkin-Elmer F 30 à détecteur à ionisation de flammes, équipé d'une colonne d'OV_1 1 % sur chromosorb WHP (estrogènes).

II) PROGESTERONE ET ESTROGENES LIBRES PLASMATIQUES ET URINAIRES

1) - Réactifs

- Cyclohexane, benzène, formamide, heptane, éthanol sont des produits Merck.
- Le dioxane Prolabo RP est passé sur colonne d'alumine avant emploi. L'acétate d'éthyle Prolabo RP est distillé extemporanément pour chaque extraction. Le méthanol Prolabo RP est utilisé sans autre purification.
- La célite Johns Manville a été purifiée comme il a été décrit dans la première partie de cette thèse.
- Le séphadex LH 20 (ce séphadex est spécialement conçu pour l'emploi de solvants organiques) et le Dextran T 70 proviennent de Pharmacia (Upsala, Suède).
- Le florisil (Sochibo - KLL. Lab. Ltd), 60-100 mesh, est lavé par de l'eau bidistillée jusqu'à l'obtention d'une eau de lavage limpide, puis il est séché durant une nuit à 110°C.
- Le charbon végétal Norit provient de Prolabo; le chlorure de sodium, la gélatine et l'azide de sodium sont également des produits Prolabo RP.
- Les phosphates mono- et disodique respectivement 1 et 12-H_2O sont des produits Merck.
- Le naphtalène provient de Prolabo; le PPO (2,5-diphényl oxazol) et le diméthyl-POPOP sont des produits Packard.

2) Stéroïdes

- La corticostérone-1,2-^3H (44Ci/mM), l'estrone-6,7-^3H (40 Ci/mM), l'estriol-6,7-^3H (42,2 Ci/mM) et l'estradiol-2,4,6,7-^3H (110 Ci/mM) sont des produits New England Nuclear (NEN). L'estradiol-6,7-^3H (48 Ci/mM) provient du CEA. Les

estrogènes radioactifs sont purifiés chaque mois par chromatographie sur la colonne de séphadex qui sera décrite plus loin.

- Les stéroïdes non radioactifs ont, pour une partie, été synthétisés dans le laboratoire (Thèse de B. Desfosses,1973); d'autres stéroïdes proviennent soit de Roussel UCLAF soit de Ikapharm (Ramat Gan, Israël), soit encore de Stéraloïds.

3) Solutions

- Tampon phosphate 0,1 M, pH 7.11 contient par litre d'eau bidistillée :

Na_2HPO_4-12 H_2O	24,774 g
NaH_2PO_4-1 H_2O	4,248 g
NaCl	9 g
Azide de sodium	1 g

Après dissolution des réactifs et vérification du pH, le mélange est additionné de 0,1 % de gélatine. La dissolution est facilitée en chauffant légèrement la solution.

- Les gammes d'estrogènes utilisées pour les courbes standard sont réalisées à partir d'une solution mère en milieu tampon contenant 800 pg dans 0,1 ml, conservée à + 4°C. Des dilutions successives dans le tampon de cette solution sont réalisées extemporanément pour chaque dose de la courbe standard : 400, 200, 100, 50 et 25 pg dans 0,1 ml de solution.

- La suspension de charbon utilisée pour séparer les estrogènes libres des estrogènes liés aux anticorps est préparée une heure ou deux avant son utilisation de la façon suivante : 250 mg de charbon et 25 mg de dextran sont mélangés à 100 ml de tampon phosphate. Le mélange est conservé à + 4°C sous agitation magnétique permanente.

- Le scintillateur de Bray a la composition suivante :

100 g de naphtalène
7,5 g de PPO dans 1 litre de dioxane
0,3 g de POPOP

Ce scintillateur permet la solubilisation de 1,2 ml de solution aqueuse tamponnée dans 10 ml de solvant.

4) Matériel

- Agitateur Cenco (Hollande)
- Distributeur à répétition PB 600-10, adapté pour des seringues Hamilton de 5 ml et permettant de distribuer très rapidement 50 fractions de 0,1 ml d'une même solution.
- Incubateur Dubnoff
- Centrifugeuse réfrigérée Jouan K 63 F
- Spectromètre à Scintillation Intertechnique SL 30. Le préréglage de ce compteur assure une efficacité de 33 % dans les conditions utilisées avec le scintillateur de Bray. Le bruit de fond dans ces conditions est de 20 cpm.

B) - TECHNIQUES DE DOSAGE DES ESTROGENES TOTAUX ET DU PREGNANDIOL URINAIRE

I) PREGNANDIOL URINAIRE

La technique utilisée a été décrite par ADESSI et col.(1972)[1] :

5 à 10 ml d'urine sont dilués par 15 ml de tampon acétate 0,2 M, pH 4,8 et additionnés de 20 µl de suc d'Helix pomatia par ml de mélange final. L'hydrolyse est effectuée pendant 60 minutes à 50°C. L'hydrolysat refroidi est extrait par 60 ml d'un mélange acétate d'éthyle/hexane/éthanol (7/2/1). La phase organique est lavée par 30 ml d'un mélange NaOH 2N/NaCl 3M (2/1) puis par 30 ml de H_2SO_4 0,05N et enfin par 30 ml d'eau bidistillée. Les extraits secs sont repris dans 2 ml d'éthanol; la triméthylsilylation est effectuée pendant 20' à 60°C par 100 µl d'un mélange BSA/pyridine/triméthyl-chlorosilane (6/2/0,1) en présence de cholestérol ou d'épicoprostanol comme étalon interne. 2µl du mélange réactionnel sont injectés dans le chromatographe. Le temps de rétention relatif du pic obtenu par rapport à celui de l'étalon interne permet d'identifier le

prégnandiol. Sa quantification est effectuée par mesure de la surface du pic rapportée à celle de l'étalon interne, la zone de linéarité entre ces deux valeurs allant de 20 à 200 µg.

II) ESTROGENES TOTAUX URINAIRES

Deux techniques, fluorométrie ou chromatographie gazeuse, ont été utilisées pour la détermination des estrogènes. La première technique a servi à la mesure des estrogènes totaux ou des deux fractions estrone + estradiol d'une part, estriol d'autre part, chez des femmes en cours de cycle ou après diverses épreuves de stimulation. La chromatographie en phase gazeuse a permis la détermination fractionnée des trois estrogènes principaux (ADESSI et al. 1972, et 1973).

1) Technique fluorométrique

Une hydrolyse rapide des estrogènes est réalisée sur 5 ml d'urine par addition de 2000 unités de β-glucuronidase et incubation de 60' à 50°C. L'hydrolysat est extrait par 50 ml d'éther. Celui-ci est lavé par 15 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à pH 10,5. Les estrogènes sont alors extraits par deux fois 30 ml de soude N puis réextraits par 60 ml d'éther après neutralisation de la solution. L'éther est alors lavé par une solution aqueuse d'H_2SO_4 0,05N (15 ml) puis par 15 ml d'eau bidistillée et enfin évaporé à sec.

Dans le cas du dosage des deux fractions "estrone + estradiol", d'une part, estriol d'autre part, un fractionnement par partage entre le benzène/éther de pétrole (25/25 ml) et l'eau (2 x 25 ml) est réalisé. La fraction "estrone + estradiol" se trouve dans la phase organique; l'estriol qui se trouve dans la phase aqueuse est réextrait par de l'éther. Les deux extraits organiques sont évaporés à sec puis soumis à la fluorométrie selon Ittrich. Celle-ci est réalisée sur une fraction aliquote convenable de chaque extrait :

Après addition de 0,1 ml d'une solution éthanolique d'hydroquinone à 4 %, chaque extrait est évaporé à sec. Les tubes contenant

les extraits sont refroidis dans un bain-marie glacé pendant l'addition de 0,4 ml d'eau bidistillée puis de 0,8 ml d'H_2SO_4 concentré. Le mélange est ensuite plongé pendant 40 min. dans un bain-marie à 100°C puis refroidi et additionné de 1,5 ml d'eau bidistillée. Le mélange est homogénéisé puis laissé 15 min. dans un bain-marie froid. La coloration est alors extraite par addition de 2,5 ml d'une solution chloroformique à 2 % de p.nitrophénol, agitation vigoureuse et centrifugation. Après décantation de la phase organique, l'intensité de la fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluoromètre Farrand. Les concentrations en estrogènes sont données par interpolation sur une courbe standard d'estrone (ou d'estriol lorsque l'estriol seul est concerné) réalisée simultanément pour une gamme de concentrations comprises entre 100 et 600 ng.

2) Technique de chromatographie en phase gazeuse (ADESSI et col.1973)

A partir de la 15ème semaine de grossesse, il a été possible de fractionner les estrogènes dans un grand nombre d'extraits urinaires. Après une hydrolyse réalisée de la manière décrite ci-dessus, les estrogènes sont extraits par l'éther. Le passage en milieu sodique est suivi d'une neutralisation rapide par une solution diluée d'acide acétique, puis d'une nouvelle extraction par l'éther.

Les extraits secs obtenus dans ces conditions sont soumis à une triméthylsilylation comme il a été décrit plus haut. Ils sont alors analysés sur le chromatographe Perkin Elmer à détecteur à ionisation de flamme, cet appareil permettant une sensibilité de l'ordre de 5 µg pour chaque estrogène.

C) TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA PROGESTERONE URINAIRE ET PLASMATIQUE

La progestérone a été étudiée par une méthode rapide décrite par JOHANSSON (1969) et comportant une extraction dans un solvant organique puis un dosage par une technique radio-compétitive en présence d'une protéine acceptrice (transcortine).

I) EXTRACTION

Les techniques d'extraction de la progestérone dans les urines ou dans le sérum ne diffèrent que par les volumes de départ.

- 10 ml d'urine sont extraits par 10 ml de cyclohexane. L'extraction est réalisée dans des allonges sur un tapis roulant pendant 60 min. Après décantation, la phase organique est évaporée à sec. L'extrait est repris par 2 ml d'éthanol et le dosage est effectué sur une aliquote.
- 0,25 ml de sérum sont extraits par 2,5 ml de cyclohexane par agitation vigoureuse dans un tube pendant 2 min. sur un agitateur Cenco. La phase organique est décantée; 2 ml de solvant sont prélevés et évaporés à sec. L'extrait est alors repris par 2 ml d'éthanol et le dosage est effectué sur une aliquote.

II) DOSAGE PAR RADIO-COMPETITION

Cette technique est, comme la radioimmunocompétition, une technique analytique de saturation. Dans cette étude, l'agent de liaison est une protéine, à forte affinité pour la corticostérone, et présente dans le sérum de femme en fin de grossesse. Il s'agit surtout de la transcortine, et secondairement de l'orosomucoïde, plus spécifique, mais présent à des concentrations beaucoup plus faibles dans le sérum humain (7%).

Une solution contenant à la fois la protéine de liaison et le traceur est préparée avec le dosage ; le traceur utilisé est la corticostérone-1,2-^{3}H. La solution préparée est telle qu'elle contient environ 10000 cpm de traceur et 80 µg de protéines totales par ml de solution. 1 ml de cette solution est ajouté à chaque dose

connue de progestérone pure constituant la gamme d'étalonnage, ainsi qu'à chaque extrait biologique. Le mélange est incubé pendant 5 min. à 40°C sous agitation permanente puis refroidi 10 min. dans un bain-marie glacé. Les stéroïdes non liés sont adsorbés par 80 mg de florisil, qui sont alors ajoutés à chaque tube, cette addition étant suivie d'une agitation immédiate et vigoureuse à la main pendant 30 sec. Après décantation du florisil dans le fond du tube, deux prélèvements de 0,2 ml du surnageant sont effectués pour le comptage, dans des fioles auxquelles sont alors ajoutés 5 ml de liquide de scintillation. La radio-activité est mesurée dans un compteur Intertechnique. Les taux de progestérone sont donnés par interpolation du nombre de cpm obtenus sur la courbe standard de progestérone (0 à 4 ng) (fig. 13).

III) CRITERES DE CONFIANCE DE LA METHODE

L'efficacité du procédé d'extraction de la progestérone a été vérifiée pour l'urine et pour le plasma. La récupération est de 85 à 95 %. La sensibilité de la méthode permet de déterminer avec précision des taux de progestérone plasmatique de l'ordre de 0,5 ng, le taux de liaison obtenu pour 0,2 ng étant déjà nettement différencié de celui obtenu au point 0 ng de la courbe d'étalonnage.

La reproductibilité de la technique de liaison compétitive peut être constatée sur la figure 13 où chaque point de la courbe standard de progestérone est la moyenne de 30 déterminations successives (les déviations standards sont représentées en chaque point).

JOHANSSON (1969) a étudié tous les aspects de la spécificité de cette technique :

La corticostérone-1,2-^{3}H est choisie comme traceur car la protéine possède plus d'affinité pour ce stéroïde que pour la progestérone et permet une plus grande sensibilité. Plusieurs stéroïdes sont capables de déplacer la corticostérone marquée liée à la transcortine; par ordre préférentiel, ce sont :

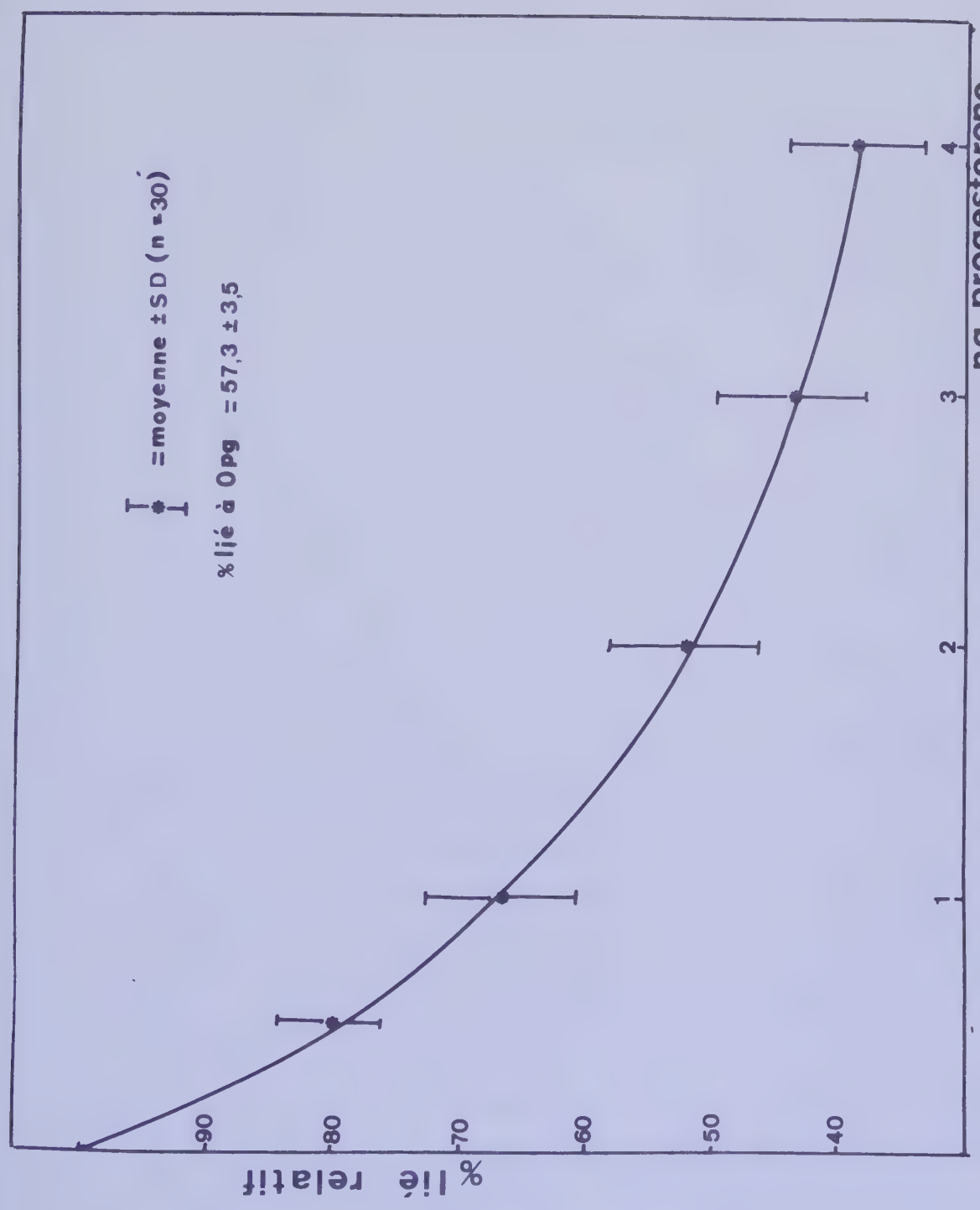


FIG.13 Courbe standard de la progestérone

a) la corticostérone
b) la progestérone, le cortisol et le 11-desoxycortisol
c) la testostérone
d) la 20-hydroxy-progestérone.

Cette compétition des stéroïdes aux sites de liaison de la transcortine est à première vue un obstacle majeur pour la spécificité de la détermination. En fait, l'extraction de la progestérone par le cyclohexane permet d'éliminer une grande partie des stéroïdes compétitifs. Dans les conditions décrites, les rendements d'extraction pour ces différents stéroïdes sont les suivants :

a) progestérone : 85,5 %
b) 17α-hydroxy progestérone : 14 %
c) 20α-hydroxy progestérone : 64 %
d) testostérone : 28,5 %
e) estradiol : 5,1 %

La corticostérone, le cortisol et le 11-désoxy-cortisol, qui étaient les stéroïdes les plus compétitifs, sont donc totalement éliminés. Seules peuvent encore interférer la testostérone et la 20α-hydroxy-progestérone. JOHANSSON a montré que la contribution de la 20α-hydroxy-progestérone au cours du cycle était peu importante et que les taux de progestérone au cours du cycle, mesurés après une étape intermédiaire de chromatographie étaient analogues à ceux trouvés sans fractionnement chromatographique.

En fait, il semble certain que les taux de progestérone déterminés par la technique de liaison protéique compétitive soient supérieurs à ceux donnés dans la littérature à partir de radio-immunodosages; l'écart entre les taux donnés par les deux techniques reste cependant très semblable pour les différents auteurs ayant pratiqué ces méthodes.

Nous avons actuellement mis au point dans notre laboratoire une technique de radioimmunodosage utilisant un immunsérum anti-progestérone, l'antigène étant le 11α-hémisuccinate-BSA.

Une grande partie de notre étude physiologique ayant été réalisée avant la mise au point de cette dernière technique, nous

avons préféré appliquer la première méthode pour toutes les déterminations, afin de conserver les mêmes normes de comparaison.

D) TECHNIQUE DE DOSAGE DES ESTROGENES LIBRES PLASMATIQUES ET URINAIRES

De même que pour la progestérone, une même technique d'extraction des estrogènes a été appliquée pour les urines et le sérum, seuls les volumes de départ étant différents. Les estrogènes extraits ont été soit directement dosés par l'intermédiaire d'immun-sérums très spécifiques, soit dosés après une étape de fractionnement sur colonne.

I) EXTRACTION

Avant l'extraction des estrogènes, les sérums et les urines sont additionnés d'une très faible quantité d'estrone, d'estradiol et d'estriol radioactifs afin de pouvoir évaluer précisément les rendements des différentes étapes de la technique (environ 1000 cpm soit moins de 10 pg).

2 à 20 ml d'urine ou 0,2 à 2 ml de sérum suivant les cas étudiés (cycle humain normal, corps jaune pseudogestatif, début de grossesse, etc...) sont extraits par 25 ou 5 ml d'un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (50/50). Cette extraction est effectuée par agitation lente pendant une heure dans des erlens. La séparation des phases aqueuse et organique est obtenue par congélation brutale de la phase aqueuse dans un milieu réfrigérant et décantation de la phase organique. Celle-ci est évaporée à sec.

L'extrait sec ainsi obtenu est alors soit utilisé directement pour le radioimmunodosage, soit fractionné sur colonne.

II) CHROMATOGRAPHIE

Deux types de colonne ont été testés :

1) Colonne de célite

La chromatographie sur célite est effectuée dans des pipettes de 5 ml dont la pointe est partiellement obturée par une bille de

verre et un tampon de coton de verre. 500 mg de célite sont mélangés soigneusement avec 0,25 ml de formamide, puis tassés dans la pipette par aspiration sous vide. La célite est alors saturée par 15 à 20 ml d'heptane. L'extrait est déposé sur la colonne dans 3,5 ml d'heptane. Les stéroïdes sont élués par des mélanges d'heptane et d'acétate d'éthyle de polarité croissante. Le schéma d'élution est le suivant :

22 ml d'heptane 100 %	stéroïdes neutres
10 ml d'heptane/acétate d'éthyle (95/5)	estrone
1 ml d'heptane/acétate d'éthyle (80/20)	éluat non conservé
5 ml d'heptane/acétate d'éthyle (80/20)	estradiol

L'estriol n'est élué que très tard sur cette colonne et dans un volume important de solvant.

2) Colonne de séphadex LH 20

Ce type de colonne a été décrit par WU et LUNDY (1971). La chromatographie est effectuée dans une seringue de 2 ml à laquelle a été soudé un réservoir en pyrex pouvant contenir 20 ml de liquide et fermé par un bouchon Sovirel. Le séphadex LH 20 est retenu dans la seringue par un petit bouchon de coton de verre. Le séphadex (400 mg par colonne) est mis à gonfler préalablement pendant une nuit dans un mélange benzène/méthanol (85/15) avant d'être versé dans la colonne. Ce même mélange de solvants est utilisé pour l'élution des estrogènes. Après lavage de la colonne de séphadex par 15 ml d'éluant, la colonne est prête pour son utilisation.

L'extrait à chromatographier est déposé sur la colonne dans trois fois 0,1 ml de solvant, puis l'élution est effectuée ainsi :

0 - 0,9 ml	cet éluat est rejeté
0,9 - 1,4 ml	cet éluat contient l'estrone
1,4 - 1,8 ml	cet éluat n'est pas conservé
1,8 - 2,5 ml	cet éluat contient l'estradiol
2,5 - 3,2 ml	cet éluat n'est pas conservé
3,2 - 4,4 ml	cet éluat contient l'estriol

Le schéma d'élution est représenté sur la figure 14. Les colonnes de séphadex LH 20 peuvent être utilisées un grand nombre de fois (durant 2 à 3 mois). Entre les fractionnements successifs

de deux extraits biologiques, le séphadex est simplement lavé par 8 ml du mélange benzène/méthanol 50/50, puis par 15 ml du mélange d'élution.

III) RADIOIMMUNODOSAGE

Trois immunsérums ont été utilisés pour la détermination des estrogènes : un immunsérum antiestriol-17β-succinate, mis à notre disposition par B.V. CALDWELL, et possèdant une bonne affinité pour l'estrone et surtout pour l'estradiol; un immunsérum antiestradiol-6-CMO, de très haute spécificité également (L 1244). Ces différents immunsérums seront décrits en détails dans le chapitre suivant. La dilution de ces immunsérums lors de leur utilisation pour le dosage, est déterminée de façon à fixer 40 % de l'estrogène marqué.

Les extraits biologiques, après ou sans fractionnement sur séphadex, sont évaporés à sec et repris dans un volume adéquat de tampon phosphate. Deux prises d'essai de 0,1 et 0,2 ml sont effectuées pour le dosage dans des tubes à hémolyse en polyéthylène. La gamme est réalisée à partir d'une série de solutions tampon contenant respectivement 25, 50, 100, 200 et 400 pg d'estrogène par 0,1 ml de solution. Lorsqu'il y a lieu, un extrait de solvant d'élution, passé sur colonne et repris dans le tampon, est ajouté à chaque tube de la gamme, dans la même proportion que celle utilisée pour les extraits biologiques. Une fraction de 1/10 de chaque extrait est également prélevée et la radioactivité présente est comptée en présence de scintillateur de Bray pour la détermination de la récupération de chaque estrogène. Le volume de chaque tube de dosage est ajusté à 0,2 ml; 0,1 ml de l'immunsérum dilué est ajouté à chaque tube; après homogénéisation, 0,1 ml de tampon contenant 8000 à 10.000 cpm d'estrogène traceur est ajouté. Cette distribution de l'immunsérum et du traceur est effectuée très rapidement à l'aide d'une seringue Hamilton munie d'un distributeur à répétition. Le mélange est agité puis mis à incuber pendant 2 h 30 à 4°C. Après l'incubation, les tubes sont additionnés de 1 ml d'une suspension de charbon, agités pendant 30 sec. à l'agitateur Cenco puis laissés à 4°C pendant 20 min. Les estrogènes libres sont ainsi adsorbés sur

le charbon. Une centrifugation est alors effectuée pendant 10 min. à 4°C à 2500 g. Le surnageant qui ne contient plus que des estrogènes liés est décanté dans une fiole de comptage, additionné de 10 ml de scintillateur de Bray, puis compté. La courbe standard de déplacement du stéroïde tritié en fonction des concentrations croissantes de stéroïde froid est tracée. Le premier point de la courbe à 0 pg de stéroïde froid est arbitrairement choisi comme 100 % de stéroïde lié.

IV) ETUDE CRITIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA METHODE

1) L'étape d'extraction

Cette étape présente essentiellement les avantages de rapidité d'exécution et d'efficacité de récupération; les solvants utilisés présentent moins d'inconvénients que l'éther, plus couramment employé par les différents auteurs. Le système de décantation par congélation de la phase aqueuse est particulièrement rapide et facile, assurant par ailleurs une sécurité absolue dans la séparation des deux phases. L'efficacité de l'extraction est confirmée par les chiffres présentés dans le tableau XIII et indiquant les moyennes et les déviations standard pour un grand nombre d'extractions.

2) La colonne de chromatographie

La colonne de célite, simple et rapide, permet une bonne séparation des stéroïdes avec un bon rendement (estrone = 82 %; estradiol = 89 %). Elle présente cependant plusieurs inconvénients : l'estriol est difficilement élué de cette colonne; le "témoin solvant" déterminé à partir de solvant passé sur colonne, évaporé à sec et traité comme les extraits biologiques reste proche de 50 pg. Enfin, certains extraits plasmatiques sont difficilement repris par l'heptane et sont donc déposés de manière non quantitative sur la colonne.

Il semble, par contre, que la colonne de séphadex LH 20 ne comporte pas de tels inconvénients. Par ailleurs, ce type de colonne présente l'intérêt de pouvoir être utilisé plusieurs fois et donc d'être installé en série de façon permanente. La séparation des

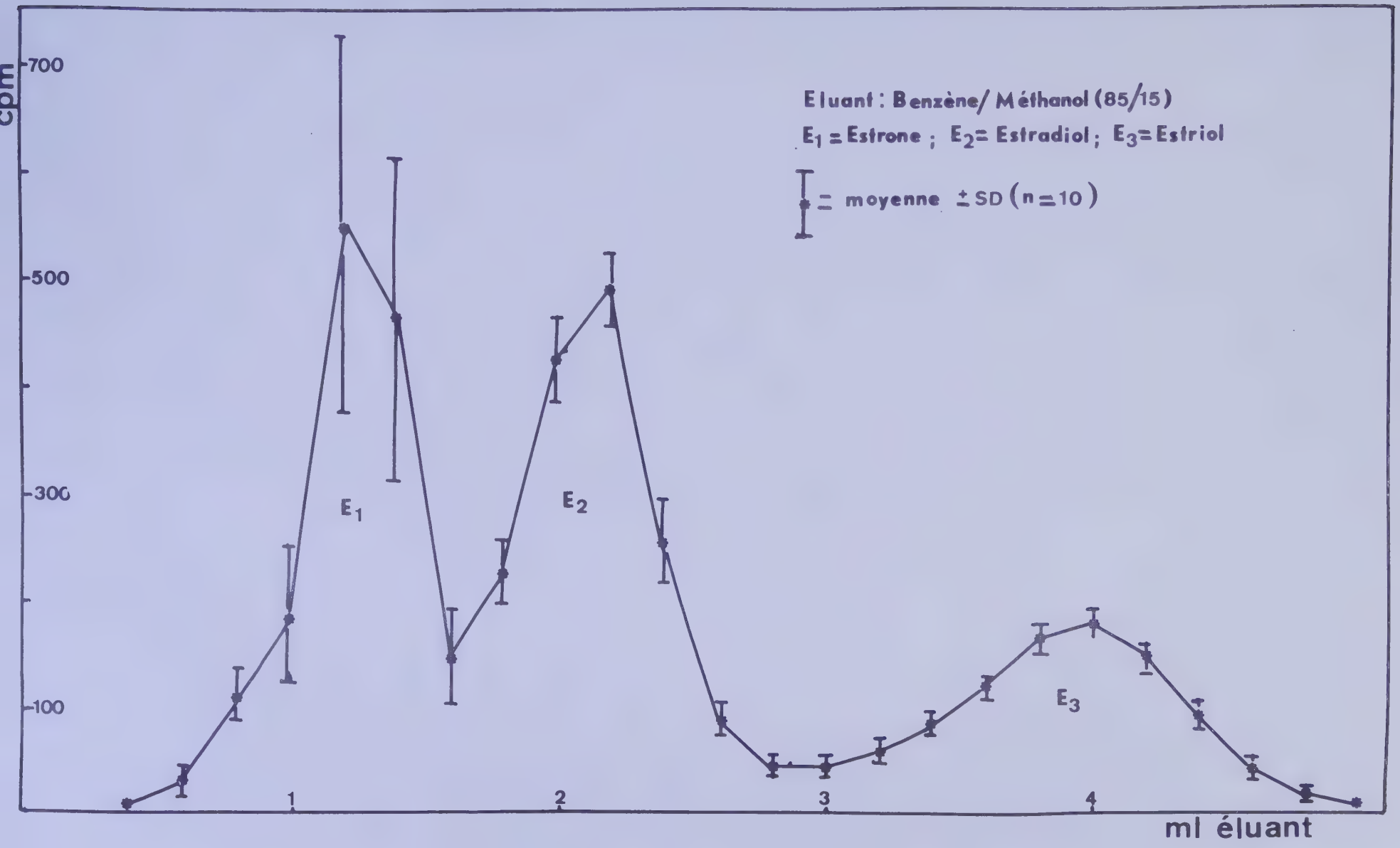


FIG.14 Colonne de séphadex LH 20 : Schéma d'élution des estrogènes

trois estrogènes principaux est d'une efficacité et d'une reproductibilité remarquables, compte tenu des très petits volumes d'élution de chaque estrogène (fig. 14). La récupération est de 80 à 85 % pour l'estrone, 90 à 100 % pour l'estradiol et de 65 à 75 % pour l'estriol. Nous avons vérifié que le fractionnement des estrogènes était aussi efficace et reproductible quelle que soit la quantité d'estrogène déposée. Cet essai a été réalisé en chromatographiant sur la colonne des quantités de stéroïdes purs en concentrations analogues à celles trouvées dans le sérum humain en fin de grossesse, l'élution étant contrôlée par fractions de 0,1 ou 0,2 ml. Les résultats, très satisfaisants, ont confirmé l'intérêt de ce type de colonne.

Le "témoin solvant" de la colonne de séphadex est négligeable (inférieur à 10 pg); nous préférons cependant, étant donné l'usage répété des colonnes, nous garantir de toute contamination passagère des solvants ou du séphadex en ajoutant à chaque tube de la gamme d'étalonnage un extrait de solvant correspondant à ce témoin et repris par le tampon.

Le rendement de ces différentes étapes d'extraction et de fractionnement a été vérifié de la façon suivante :

Des traceurs ayant été ajoutés aux sérums et aux urines avant l'extraction des estrogènes, une aliquote de chaque extrait est prélevée au moment du radioimmunodosage pour la détermination de la récupération. Les récupérations moyennes de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol obtenues après ou sans fractionnement sur colonne, sont données dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

RECUPERATION MOYENNE ($\pm$ SD) DES ESTROGENES PLASMATIQUES ET URINAIRES APRES OU SANS FRACTIONNEMENT

		Sans fractionnement	Après fractionnement
		%	%
Sérums	Estrone		66,32 $\pm$ 11,46 (17 %) (n = 50)
	Estradiol	85,84 $\pm$ 6,9 (8 %)[1] (n = 34)[2]	67,57 $\pm$ 9,22 (14 %) (n = 50)[2]
	Estriol	83,5 $\pm$ 11,3 (14 %) (n = 39)	54,65 $\pm$ 9,88 (18 %) (n = 50)
Urines	Estrone		69,07 $\pm$ 14,9 (21 %) (n = 31)
	Estradiol		55,23 $\pm$ 10,3 (19 %) (n = 31)
	Estriol	81,9 $\pm$ 10,4 (13 %) (n = 6)	53,8 $\pm$ 7,0 (13 %) (n = 31)

1 - coefficient de variation; 2 - n = nombre de déterminations.

La précision de la méthode a été contrôlée par détermination des taux d'estrone, d'estradiol et d'estriol dans des sérums ne contenant pas d'estrogènes endogènes et sur lesquels ont été effectuées des surcharges de ces trois estrogènes.

L'immunsérum utilisé pour le dosage de l'estrone et de l'estradiol dans cette expérience était l'anti-estradiol-17β-succinate; un fractionnement des extraits sur colonne de séphadex a donc été effectué avant le dosage. L'estriol a été déterminé par l'intermédiaire de l'immunsérum très spécifique L 1244 sur des extraits bruts de sérums surchargés en estriol.

Les résultats obtenus sont indiqués sur le tableau XIV.

TABLEAU XIV

SURCHARGES D'ESTRONE, D'ESTRADIOL ET D'ESTRIOL EFFECTUEES SUR DES SERUMS.

(Pourcentages de récupération, déviations standards et nombres de déterminations)

pg estrogène ajouté/ml sérum	Estrone (%)	Estradiol (%)	Estriol (%) valeur par rapport au 100% obtenu en présence d'extrait de sérum.
100	158- (n=2)	103 (n=2)	91,1±11,4 (n=3)
200	115,5±32,4 (n=4)	90±11,2 (n=5)	93,8- (n=2)
400	156,7±29,7 (n=4)	95± 7,3 (n=4)	102,1±2,7 (n=6)
800	161,5 (n=2)	98 (n=2)	

Ces résultats montrent que pour l'estradiol, les valeurs obtenues pour les surcharges indiquent une assez bonne précision.

Par contre, en ce qui concerne l'estrone et l'estriol, les surcharges effectuées sur le sérum donnent lieu à des écarts pouvant atteindre 20 à 30 %. Il est possible, dans le cas de l'estriol, de corriger ces valeurs en rapportant les pourcentages de liaison à un 100 % obtenu en présence d'un extrait de sérum ne contenant pas d'estrogène. Il est à remarquer que des anomalies d'immunodosages réalisés en présence de sérum ont été observés par plusieurs auteurs; en particulier, la mise en évidence d'une fraction protéique du sérum interférant sur le dosage a été effectuée par HENDRICK (1972).

3) Radioimmunodosage

A chaque étape de la réaction de radioimmunodosage, nous avons étudié l'influence des facteurs temps, température, pH du milieu, etc... Ces études ont été faites d'une façon plus systématique sur l'estriol.

a) Stabilité des estrogènes dans le tampon

Les solutions d'estrogènes purs utilisés pour la réalisation des gammes d'étalonnage sont, comme nous l'avons indiqué, préparées extemporanément à partir d'une solution mère contenant 800 pg d'estrogène par ml de tampon et conservée de 4 à 6 semaines à 4°C. Nous avons vérifié la stabilité des estrogènes à cette dilution dans le tampon en réalisant à intervalles de temps réguliers, des gammes d'étalonnage à partir de cette solution mère, par radio-immunodosage. Le tableau XV présente les déplacements de l'estrogène non radioactif, en chaque point de la gamme, au bout de 1 jour, 1 et 2 mois de conservation de la solution.

Les variations peu significatives observées sur ce tableau sont du même ordre de grandeur que celles constatées lors de l'étude de reproductibilité des courbes standards.

TABLEAU XV

MODIFICATION DU POURCENTAGE LIE DU TRACEUR A L'ANTICORPS EN CHAQUE POINT DE LA GAMME D'ETALONNAGE, PAR VIEILLISSEMENT DE LA SOLUTION MERE A 800 PG/ML EN MILIEU TAMPON.

Dose d'estrogène	25 pg	50 pg	100 pg	200 pg	400 pg
ESTRONE					
1 jour	82 %	68 %	49 %	30 %	17 %
1 mois	88	76	52	32	20
2 mois	87	73	50	31	18
ESTRADIOL					
1 jour	76	59	40	23	13
1 mois	75	53	35	21	14
2 mois	77	57	35	21	14
ESTRIOL					
1 jour	94	88	79	63	46
1 mois	92	84	72	55	40
2 mois	92	89	76	61	42

b) Reproductibilité des courbes standards

La reproductibilité des courbes standards de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol a été contrôlée en faisant la moyenne des valeurs obtenues en chaque point de la gamme, et ceci pour un grand nombre de gammes obtenues dans les mêmes conditions. Les valeurs obtenues pour ces moyennes et pour les déviations standards sont indiquées dans le tableau XVI. Les courbes standards moyennes résultant de ces valeurs sont présentées dans la Figure 15. Les valeurs des coefficients de variation en chaque point des trois courbes permettent de confirmer une grande précision des courbes standards, notamment pour des quantités d'estrogènes inférieures à 200 pg. (CV inférieurs à 10 %).

c) Effet du temps d'incubation et de la température sur la réaction antigène - anticorps.

Ce facteur a été étudié par de nombreux auteurs pour les différentes techniques de radioimmunocompétition. Dans le système à phase solide, décrit par ABRAHAM et al. (1970)[1] et par EXLEY (1971) pour l'estradiol-17β, l'incubation peut se faire à température ambiante durant 2 à 20 heures; d'après ces auteurs, la liaison serait plus forte avec une sensibilité accrue, lorsque le temps d'incubation est prolongé jusqu'à 16 ou 20 heures. De même, MIKHAIL et al. (1970)[1], qui utilisent un anticorps anti-estradiol polymérisé, réalisent l'incubation à température ambiante. La courbe standard de l'estradiol permet une sensibilité beaucoup plus grande lorsque la durée d'incubation est prolongée jusqu'à deux heures. MIDGLEY et al. (1969) utilisent un système à double anticorps, chaque étape d'incubation nécessitant un à deux jours.

La technique que nous utilisons a été également appliquée par TULCHINSKY (1971) pour la détermination de l'estriol. Cet auteur a observé qu'un temps d'incubation de deux heures à 4°C permettait d'atteindre 90 à 95 % de la capacité maximum de liaison. Cependant, il n'a constaté aucune modification ultérieure de la liaison lorsque pour des raisons pratiques, la durée de l'incubation était maintenue pendant 16 à 18 heures.

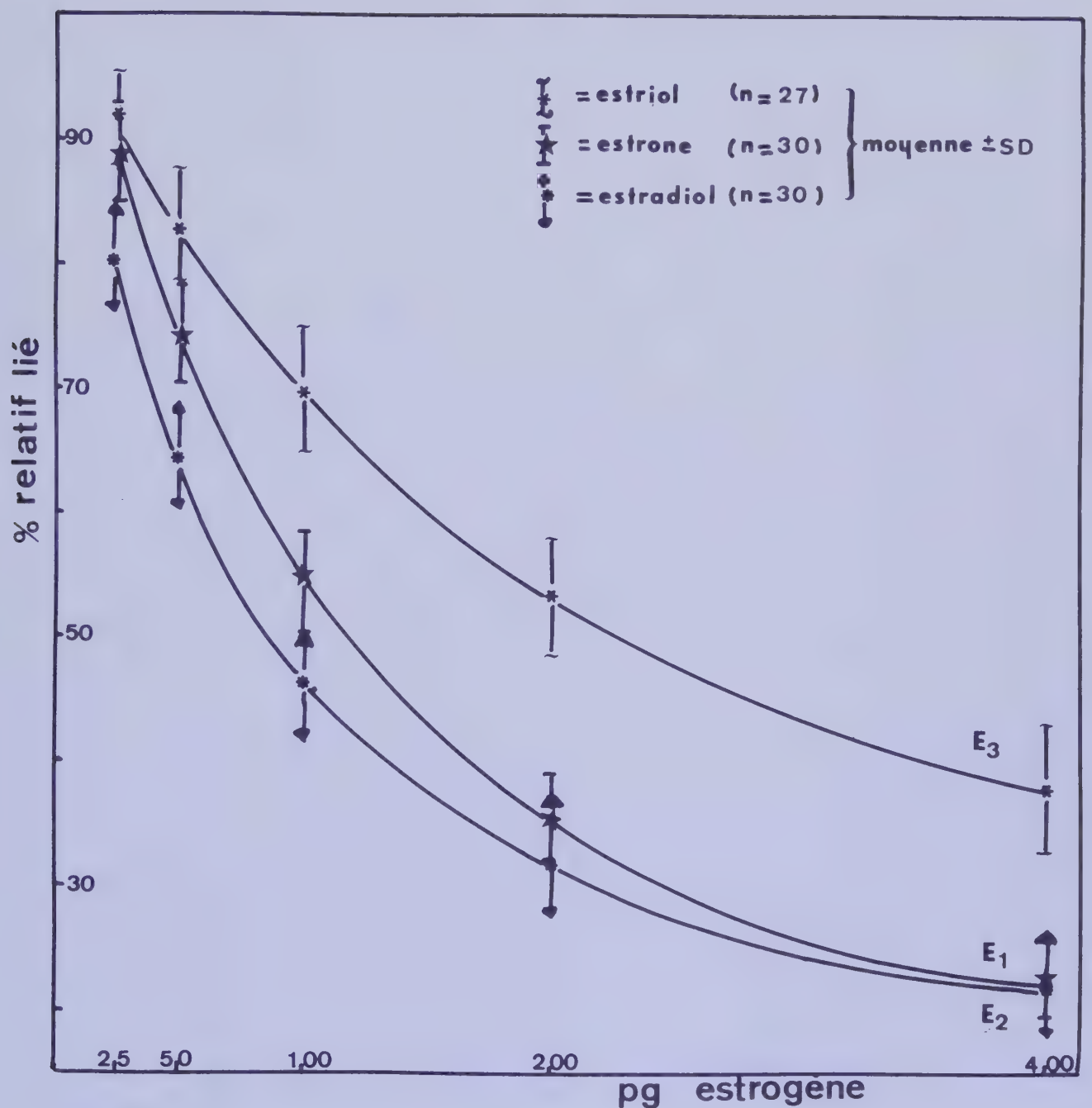


FIG.15

Courbes standards d'estriol, d'estrone et d'estradiol

Immunsérums respectifs : antiestriol-6CMO L1244
antiestradiol 17β succinate
antiestradiol-6 CMO L 4386

TABLEAU XVI

VALEURS MOYENNES DES % DE FIXATION DU TRACEUR A L'ANTICORPS
OBTENUES EN CHAQUE POINT DE LA COURBE D'ETALONNAGE POUR UN GRAND NOMBRE DE COURBES

Dose d'estrogène	25 pg	50 pg	100 pg	200 pg	400 pg
ESTRONE (n = 30)[2]	88,9 ± 3,9 (4 %)[1]	74,7 ± 3,8(5%)	54,6 ± 3,9(7%)	35,7 ± 3,5(10%)	22,7 ± 3,3(14%)
ESTRADIOL (n = 30)	80,6 ± 3,0(4%)	64,3 ± 4,3(7%)	46,3 ± 4,3(9%)	32,0 ± 4,5(14%)	21,5 ± 4,4 (20%)
ESTRIOL (n = 27)	91,9 ± 4,1(4%)	82,8 ± 4,7(6%)	70,0 ± 4,8(7%)	53,3 ± 5,2(10%)	37,6 ± 5,1 (14%)

1 = coefficient de variation

2 = n = nombre de déterminations

Nous effectuons pour notre part l'incubation de l'antigène avec l'anticorps à la température de 4°C; RODBARD et al. (1971) ont en effet montré que lorsque l'équilibre est réalisé à température ambiante ou même à 37°C, il est atteint beaucoup plus rapidement mais avec le désavantage d'une grande instabilité de la protéine à cette température et donc d'une grande instabilité dans les résultats. L'effet de la durée de l'incubation sur l'efficacité de la liaison entre l'antigène et l'anticorps a été vérifié avec un des immunsérums anti-estriol que nous avons préparés. Cette étude a été réalisée en faisant incuber une même quantité d'estriol-6,7-^{3}H pendant des temps variant de une heure jusqu'à 16 heures avec l'immunsérum dilué de manière à avoir 40 à 50 % de liaison et en l'absence de stéroïde froid. Les modifications du pourcentage d'estriol radioactif fixé aux anticorps en fonction de la durée d'incubation, sont indiquées dans le tableau XVII.

TABLEAU XVII

EFFET DE LA DUREE D'INCUBATION SUR LA LIAISON ANTIGENE-ANTICORPS
(Immunsérum anti-estriol L 1258, Traceur = estriol-6,7-^{3}H)

Durée d'incubation	1h	1h30	2h	2h30	3h	16h
% de liaison	27,2	35,3	42,4	43,3	43,2	44

Nos résultats rejoignent donc ceux présentés par TULCHINSKY (1971). L'efficacité de la liaison augmente surtout de 1h à 2h, l'augmentation étant ensuite négligeable jusqu'à 16 heures.

En pratique, l'incubation est réalisée soit pendant un minimum de 2 h 30 qui assure une liaison maximum, soit pendant une nuit sans introduire d'erreur appréciable.

d) Effet de la séquence d'introduction des réactifs

Le problème du temps d'incubation que nous venons de mentionner est en fait lié à un autre facteur important, à savoir l'ordre de mise en contact des trois réactifs : antigène froid, antigène marqué et anticorps.

Nous avons tenté d'introduire simultanément le traceur et l'anticorps dans le tube contenant les estrogènes de la gamme, en laissant incuber le mélange pendant trois heures. Cet essai a été réalisé pour l'estradiol.

La figure 16 montre les courbes d'étalonnage obtenues de deux manières différentes, soit en introduisant simultanément le traceur et l'anticorps dans les tubes contenant l'estrogène froid, soit en ajoutant successivement l'anticorps, puis le traceur. Il semble évident que la sensibilité est bien meilleure lorsque l'antigène marqué est ajouté en dernier lieu au mélange d'incubation.

RODBARD (1971) a résolu mathématiquement ce problème de la séquence d'introduction des réactifs en réalisant une étude approfondie de la cinétique des radioimmunodosages. Ses conclusions sont les suivantes :

- Si les trois réactifs sont mis simultanément en présence, il est très important, pour obtenir précision et sensibilité, de poursuivre l'incubation jusqu'à atteinte de l'équilibre, avant de séparer les deux fractions de traceur, libre et liée à l'anticorps.

- Si l'antigène marqué et l'anticorps sont préalablement incubés avant l'addition de l'antigène non marqué, la dissociation du complexe formé entre les deux premiers réactifs est très difficile à obtenir, et la durée d'incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre sera extrêmement longue.

- Si l'antigène non radioactif et l'anticorps sont incubés à l'équilibre avant addition du traceur (ce qui, pour l'estradiol, demande environ 8 heures), la courbe d'étalonnage présentera une pente plus forte, c'est-à-dire permettra une sensibilité plus

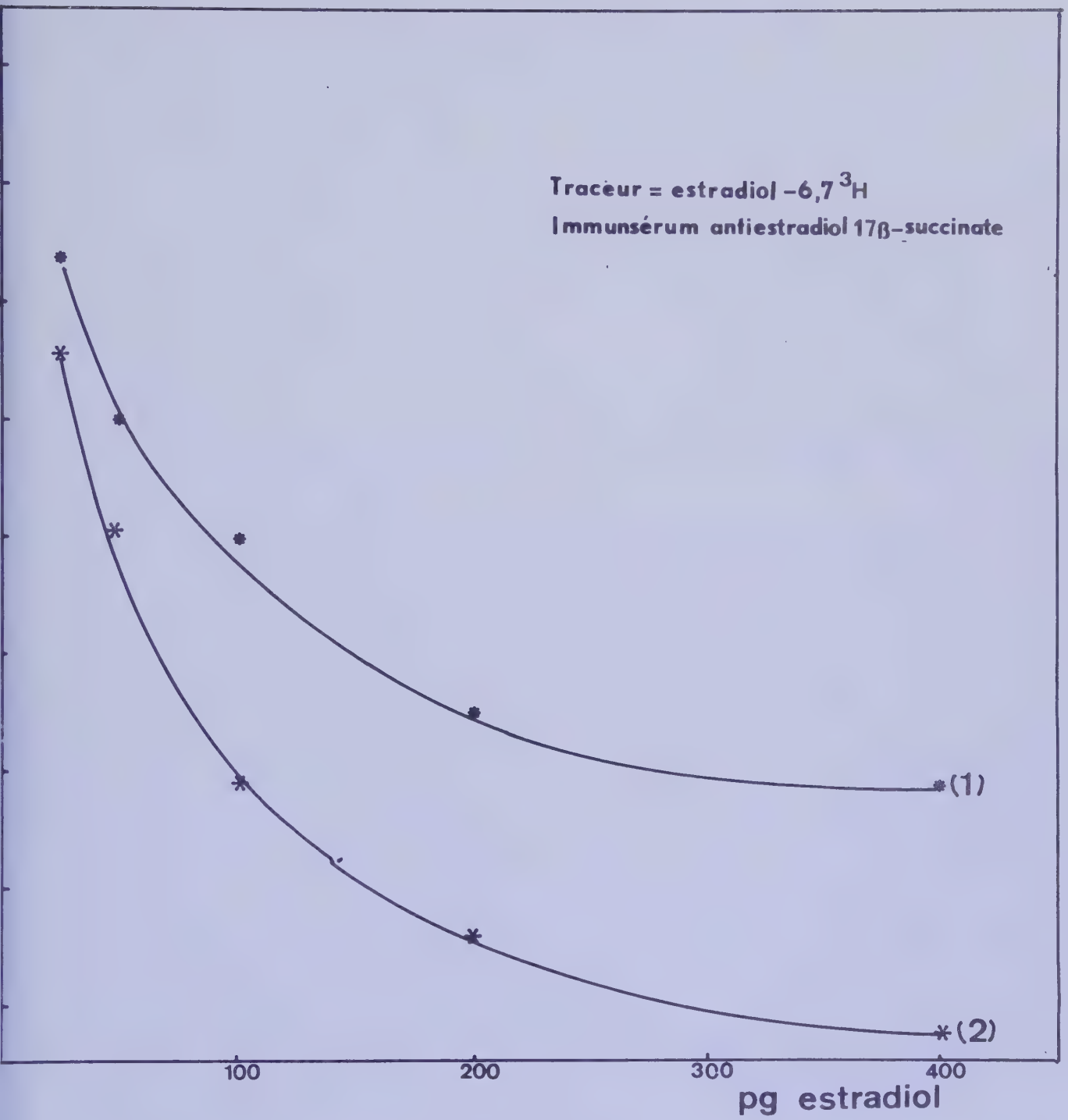


FIG.16

Influence de la séquence d'introduction des réactifs sur la courbe standard.

Courbe (1) Introduction de a)estradiol froid, b)immunsérum c) traceur

Courbe (2) Introduction de a)estradiol froid, b)immunsérum et traceur

grande des déterminations, si la durée d'incubation de l'antigène marqué n'est pas prolongé jusqu'à l'équilibre (2 heures sont en général suffisantes).

En pratique, de nombreux auteurs réalisent une pré-incubation de l'antigène froid avec l'anticorps pendant 30 min. avant d'ajouter le traceur et d'incuber à nouveau le mélange de 3 à 16 heures. MIKHAIL (1970)[1] a décrit une technique utilisant une solution d'anticorps polymérisé et de traceur, stable 4 mois à 4°C. Cet auteur constate cependant que la sensibilité de la courbe d'étalonnage est plus grande lorsqu'il fait incuber l'anticorps et l'antigène froid pendant 30 min. à température ambiante avant d'ajouter le traceur.

e) Temps d'incubation du stéroïde non lié avec la norite

L'étape de séparation des fractions liée et non liée aux anticorps est une étape conditionnant particulièrement la précision du radioimmunodosage. Nous avons vérifié, dans nos conditions de travail, l'importance du temps d'incubation en présence de norite sur la sensibilité et la précision de la technique : la diminution du nombre de cpm d'estriol-6,7-^{3}H présents dans le surnageant après addition de la suspension de norite, a été notée lorsque la durée du contact était prolongée de 0 à 60 min. Cet essai a été réalisé :

- avec l'estriol radioactif seul et sans immunsérum (1)
- avec l'estriol radioactif et après incubation avec l'immunsérum (2)
- en présence de 50 pg d'estriol non radioactif (3)
- en présence de 300 pg d'estriol (4).

La figure 17 représente la cinétique de l'adsorption de l'estriol dans ces différents cas. Le pourcentage lié indiqué sur cette figure a été mesuré par rapport à la quantité de cpm trouvés dans le surnageant au temps $t = 0$, c'est-à-dire immédiatement après addition de la suspension, et sa variation représente donc exclusivement l'augmentation de la quantité d'estriol fixée sur la norite au cours du temps. Il ressort de ces résultats que - d'une part, le phénomène d'absorption d'un stéroïde sur la norite

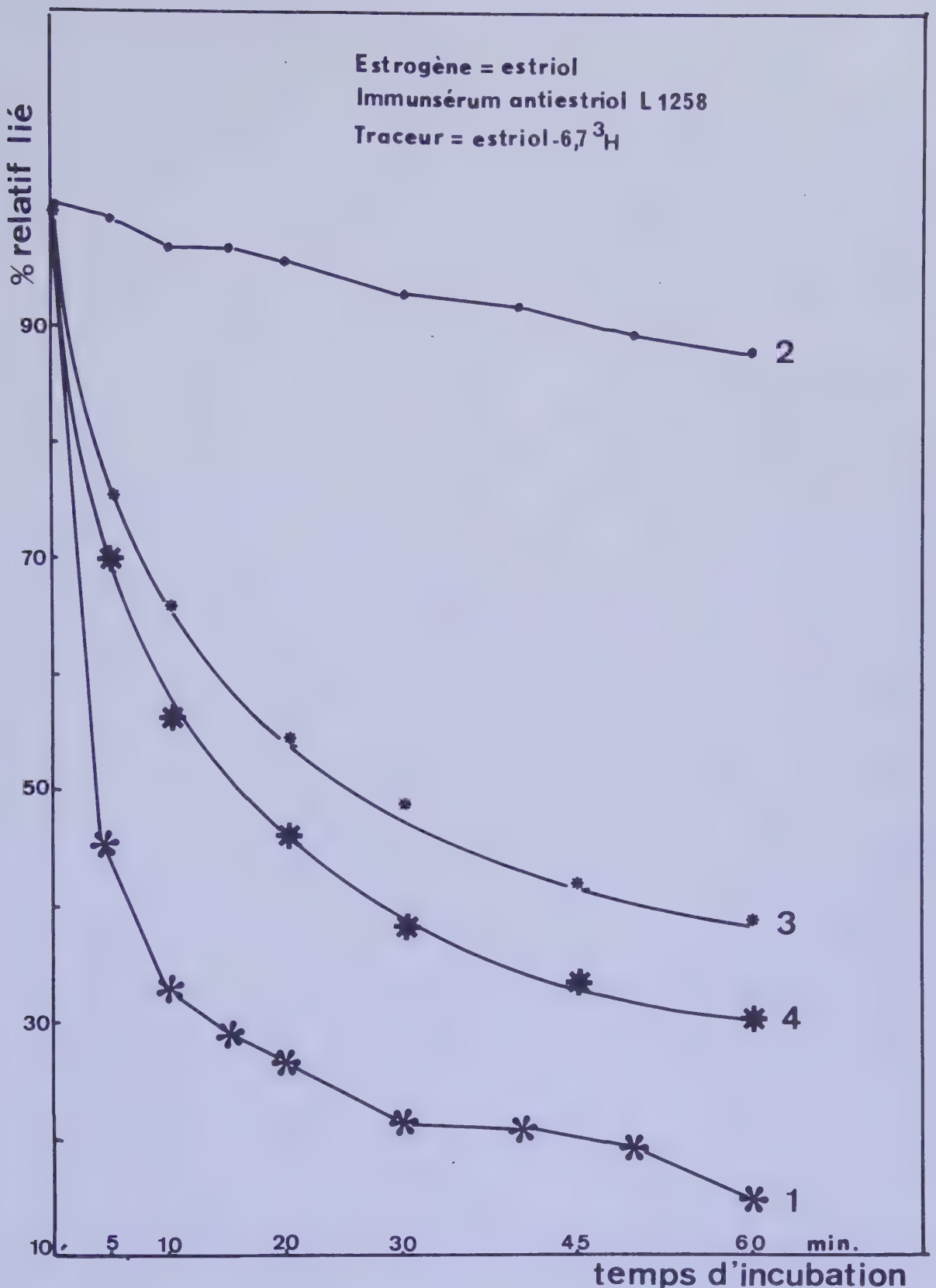


FIG.17 Vitesse d'adsorption des stéroides libres sur la norite

(1) adsorption de 10.000cpm estriol-6,7^{3}H libre

(2) adsorption de 10.000cpm estriol-6,7^{3}H après incubation avec l'immunsérum

(3) adsorption de 10.000cpm estriol-6,7^{3}H + 50pg estriol après incubation avec l'immunsérum

(4) adsorption de 10.000cpm estriol-6,7^{3}H + 300pg estriol après incubation avec l'immunsérum

peut être observé à l'état pur grâce à la courbe (1) où seuls se trouvent en présence le traceur et la norite : une adsorption quasi totale nécessite un temps d'incubation minimum de 20 min., la quantité de stéroïde absorbé n'augmentant pas de plus de 5 % dans les 40 min. suivantes. Une fraction de 10 à 15 % reste définitivement non absorbée quel que soit le temps de contact.

- d'autre part, en présence de deux fractions de stéroïde, une fraction libre et une fraction liée à des anticorps, 65 à 75 % de la fraction libre se fixent sur le charbon au cours des 20 premières minutes de contact, l'adsorption ultérieure se réalisant très lentement. Une différence de quelques minutes entre l'addition du charbon à tous les tubes d'une série de dosage se traduira donc par une très grande imprécision si la durée totale du contact avec la norite est inférieure à 20 min. Par contre, cette même différence aura très peu de conséquences lorsque la durée d'adsorption sera prolongée jusqu'à 20 et surtout jusqu'à 30 min.

Parmi les auteurs qui utilisent une suspension de charbon-dextran pour l'adsorption de la fraction de stéroïde libre, certains centrifugent le mélange immédiatement après addition de la suspension et agitation vigoureuse (WU, 1971 et 1973); d'autres agitent le mélange pendant 10 min. à 0°C avant de centrifuger (LINDNER et al. 1972); d'autres, enfin, laissent incuber le mélange pendant 20 min. après homogénéisation avant de centrifuger (TULCHINSKY et al. 1971).

Nos résultats confirment donc les constatations faites par ce dernier auteur.

f) Effet du pH du milieu d'incubation

Nous avons vérifié dans nos conditions expérimentales, l'influence du pH du tampon sur la courbe standard d'estriol : un radioimmunodosage a été effectué avec 6 gammes d'estriol, en utilisant chaque fois un tampon de même molarité mais de pH différent (de 6 à 8,5). Le traceur, le stéroïde froid, l'immunsérum, la suspension de norite, étaient pour chaque gamme, préparés dans le

tampon correspondant.

L'expression des résultats a donné des courbes exactement superposables quel que soit le pH. Seuls les pourcentages de liaison du traceur en l'absence de stéroïde froid étaient différents (tableau XVIII).

TABLEAU XVIII

EFFET DU pH SUR LE POURCENTAGE DE LIAISON DE L'ESTRIOL-6,7-^{3}H

pH	6	6,5	7	7,5	8	8,5
% liaison	41	43	46	51	52	52

L'augmentation de la capacité de liaison de l'anticorps est importante surtout lorsque le pH varie de 6 à 7,5. Cette capacité atteint ensuite un palier de 7,5 à 8,5.

Nous avons conservé pour nos expériences un pH moyen de 7 qui assure une bonne sécurité quant à la zone de pH autorisée. Par ailleurs, ce pH est conforme à celui qui est utilisé dans les techniques de radiodosage décrites dans la littérature.

La plupart des auteurs pratiquent les radioimmunodosages en milieu tampon à un pH situé entre 6 et 8. En dehors de ces limites, il est généralement constaté un affaiblissement de la liaison anticorps-antigène. L'hypothèse suggérée par PRESSMAN et al. (1961_b et 1968) est qu'à un pH inférieur à 5, il y aurait une protonation sur une fonction carboxylique essentielle du site actif; par contre, à un pH supérieur à 8, il y aurait perte d'un proton du site actif, ceci se traduisant par une liaison moins grande avec l'haptène spécifique.

Pour TILSSON et al. (1970), la meilleure zone de pH pour les radioimmunodosages s'étend de 5,8 à 8; cet auteur ne constate

aucune variation à l'intérieur de cette zone.

Pour MIKHAIL (1970) au contraire, il y a des différences importantes de sensibilité entre les courbes standards d'estradiol réalisées à pH 6,4-7,2 ou 8, la pente de la courbe étant de plus en plus forte.

Dans ce chapitre, nous avons décrit les différentes techniques utilisées pour la détermination des stéroïdes urinaires et plasmatiques, détermination que nous avons effectuée dans un but de contribution à l'étude des fonctions lutéale et placentaire chez les mammifères. Nous avons laissé une large part à la technique de radioimmunologie qui a constitué notre plus grand effort dans ce travail. Les paramètres de cette technique sont nécessairement liés aux caractéristiques des immunsérums utilisés, tant du point de vue sensibilité que spécificité et reproductibilité.

Ce sont ces différents points que nous développons dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III

IMMUNSERUMS ANTIESTROGENES

Comme nous l'avons brièvement indiqué dans le chapitre précédent, trois types d'immunsérums ont été utilisés dans notre étude :

- Un immunsérum anti-estrogène mis à notre disposition par B.V. CALDWELL;
- Un immunsérum spécifique de l'estradiol et qui a été obtenu à partir de 6-O(carboxyméthyl)oxime estradiol;
- Un immunsérum spécifique de l'estriol dont la préparation a été décrite dans le premier chapitre.

Nous décrivons ici les propriétés de ces immunsérums, en faisant une large place à l'étude des immunsérums antiestriol.

Nous décrirons successivement l'activité et l'affinité des immunsérums, puis leur sensibilité et enfin leur spécificité, comparant ces diverses qualités avec celles des autres immunsérums antiestrogènes décrits dans la littérature.

A) - TITRE OU ACTIVITE DES IMMUNSERUMS

I) DEFINITION

L'activité d'un immunsérum antistéroïde S est en général définie par son titre, c'est-à-dire la dilution pour laquelle 50 % du stéroïde marqué S* ($\simeq$ 10.000 cpm) incubé avec l'immunsérum, sont fixés aux anticorps anti-S.

La détermination du titre se fait par l'étude des courbes de dilution : des tubes contenant une même quantité du stéroïde S* sont additionnés de 0,1 ml de dilutions progressives de l'immunsérum en milieu tampon. L'incubation est réalisée et, après séparation des fractions de stéroïde libre et liée aux anticorps anti-S, la radioactivité présente dans la fraction liée de chaque tube est déterminée.

La courbe de dilution est établie en portant sur un graphique le pourcentage de stéroïde lié en fonction de la dilution de l'immunsérum. Elle permet de déterminer la dilution correspondant à la fixation de 50 % de la radioactivité, c'est-à-dire le titre de l'immunsérum.

II) VARIATION DU TITRE AU COURS DE L'IMMUNISATION

L'évolution du titre d'un immunsérum au cours de l'immunisation a pu être contrôlée grâce aux prélèvements sanguins hebdomadaires ou bimensuels qui ont été effectués sur les animaux immunisés par le 6-O(carboxyméthyl)oxime de l'estriol conjugué à la BSA. Chaque prélèvement a été suivi de l'étude de la courbe de dilution du sérum obtenu.

Parmi les 9 animaux qui ont été soumis à l'immunisation, trois d'entre eux dont deux lapines et une brebis n'ont pas donné lieu à un enrichissement du sérum en anticorps antiestriol. Les autres animaux, dont une brebis et cinq lapines ont produit des immunsérums dont le titre a évolué de façon légèrement différente. Le tableau XIX indique les titres obtenus pour chaque immunsérum antiestriol à différentes étapes de l'immunisation. L'évolution de l'activité des immunsérums est schématisée dans la figure 18 où le logarithme du titre de chaque immunsérum est porté sur un diagramme en fonction des semaines d'immunisation.

L'absence de réponse à l'immunisation de la brebis B 4394 peut être constatée par les titres toujours aussi faibles au cours des semaines (inférieurs au 1/100). Le titre des sérums obtenus par la première technique d'immunisation par injection hebdomadaire d'antigène, est monté par paliers, le titre le plus fort ne dépassant pas le 1/2000; les titres n'évoluent plus après 17 à 25 semaines.

Les animaux immunisés par la deuxième technique comportant trois séries d'injections réparties en une cinquantaine de points ont donné des sérums dont les titres en anticorps ont augmenté plus rapidement et régulièrement. Le titre le plus fort a été dans chaque

TABLEAU XIX

EVOLUTION DU TITRE (1) DES IMMUNSERUMS ANTIESTRIOL AU COURS DE L'IMMUNISATION

Semaines d'immunisation	Sérums						
	L 1244*	L 1258*	B 2038*	B 4394*	L 8393**	L 8398**	L 8401**
6					1/55	1/40	1/25
9	1/120	1/100	1/70	1/50	1/800	1/250	1/300
11					1/900	1/300	1/600
13	1/120	1/450	1/200	1/30			
15	1/120	1/400	1/900	1/45	1/1500	1/1000	1/1700
17	1/120	1/700	1/1000	1/60	1/1500	1/600	1/1200
21	1/200	1/700	1/1500	1/60	1/3200	1/1100	1/1300
24	1/200	1/700	1/900	1/35	1/9000	1/2000	1/5000
25	1/300	1/2000	1/1000	1/35	1/8000	1/1800	1/8000
26					1/3000		
28	1/500	1/2000	1/1600	1/35		1/2000	1/4500
31		1/2000	1/1250				
32	1/700	1/2000				1/2000	1/4000

* Immunisation par injections sous-cutanées hebdomadaires pendant 32 semaines (1er procédé)
** Immunisation par une série unique d'injections intradermiques et 2 rappels (2ème procédé)

Le titre le plus fort obtenu chez chaque animal est souligné.

(1) Dilution du sérum, pour laquelle 50 % du traceur sont fixés aux anticorps

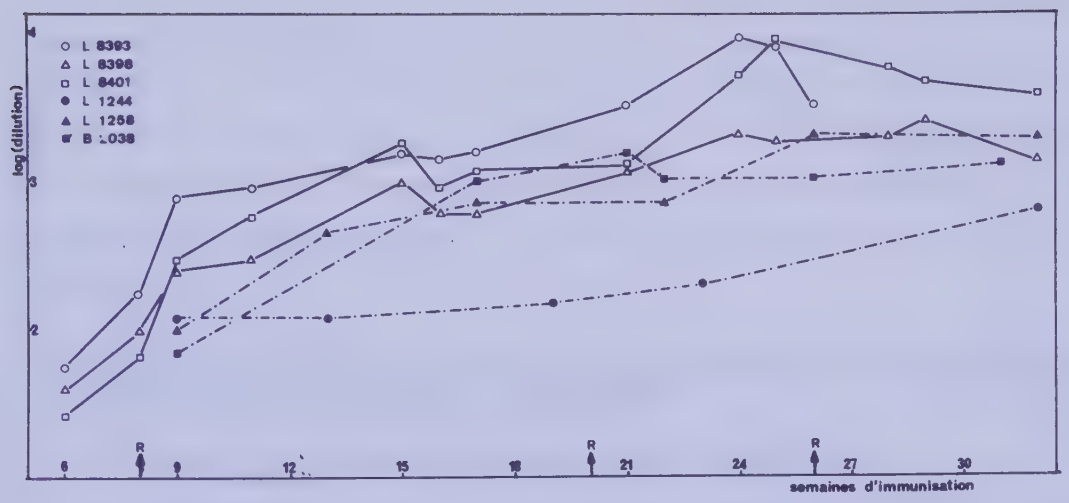


Fig.18 Evolution du titre des immunsérums antiestriol au cours de l'immunisation

----- sérums obtenus par injections sous-cutanées hebdomadaires

_____ sérums obtenus par une injection intradermique et 3 rappels(R)

cas obtenu après 24 à 25 semaines d'immunisation, les taux d'anticorps s'abaissant alors rapidement. Le titre maximum obtenu par cette méthode est le 1/9000 pour la lapine L 8393.

D'après ces résultats,il semble que la technique par une seule injection puis deux rappels présente un léger avantage sur le plan de l'activité des sérums. Par ailleurs, le pourcentage de réponse immunitaire semble meilleur puisque les trois animaux immunisés ont produit un taux correct d'anticorps alors que sur les six animaux utilisés pour la première technique, trois n'ont pas donné d'anticorps. Enfin, quelle que soit la technique d'immunisation, il semble inutile de la poursuivre plus de 25 semaines, les taux d'anticorps tendant plutôt à diminuer qu'à monter à la fin de cette période.

III) DETERMINATION DES TITRES DES IMMUNSERUMS UTILISES POUR LE DOSAGE DES DIFFERENTS ESTROGENES

1) Immunsérum antiestradiol 079-16 (Caldwell)

Nous avons étudié les courbes de dilutions de cet immunsérum, obtenues avec l'estradiol-6,7-^{3}H et l'estradiol-2,4,6,7-^{3}H. Les titres déterminés sont respectivement de 1/14000 et de 1/46000.

WU (1971) utilise également l'antiestradiol obtenu par B.V. Caldwell; il dilue ce sérum, purifié par le rivanol, au 1/10Ø00 pour doser l'estrone, et au 1/15000 pour doser l'estradiol. Il analyse l'estriol par ce même sérum, non purifié par le rivanol, et à une dilution au 1/30000.

2) Immunsérum antiestradiol L 4386

Cet immunsérum a été obtenu chez une lapine après immunisation par le 6-CMO-estradiol-BSA. D'après les courbes de dilution réalisées avec l'estradiol-6,7-^{3}H et l'estradiol-2,4,6,7-^{3}H, des titres de 1/3600 et de 1/18000 ont été respectivement déterminés.

3) Immunsérum antiestriol L 1244 et L 1258

Ces deux immunsérums ont été utilisés pour la détermination de l'estriol dans les urines et les sérums. Les titres sont de

1/700 pour le sérum de lapine L 1244 et de 1/2000 pour la lapine L 1258. Ces titres semblent relativement faibles par rapport à ceux obtenus généralement pour les autres immunsérums antistéroïdes et en particulier pour les immunsérums antiestriol décrits par GURPIDE et al. (1971) (1/10000) et surtout par TULCHINSKY et ABRAHAM (1971) (1/75000). Cette faible activité semble cependant caractéristique des immunsérums obtenus à partir de 6-carboxyméthyl oximes d'estrogènes (DRAY et al. 1971, LINDNER et al.,(1972) mais ceux-ci, comme nous le verrons ultérieurement, sont d'une spécificité remarquable.

B) - AFFINITE ET SENSIBILITE DES IMMUNSERUMS

La thermodynamique de la réaction antigène-anticorps pour un immunsérum particulier peut être étudiée sur la base de la loi d'action de masse, comme l'ont montré BERSON et YALOW (1959,1964,1968). L'affinité existant entre l'antigène et l'anticorps peut être exprimée à l'aide de la constante d'équilibre ou constante d'association K :

$$[A_c] + [A_g] \underset{k_1}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} [A_g A_c]$$

$$\text{et } K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[A_G \; A_C]}{[A_g][A_c]} \qquad \text{où } A_c = \text{anticorps}, \; A_g = \text{antigène.}$$

L'équation obtenue par application de la loi d'action de masse représente une hyperbole de laquelle on peut tirer plusieurs conclusions pratiques :

- la précision de l'analyse, donnée par la pente de la courbe est d'autant plus grande que la constante d'équilibre est grande. Ceci veut dire qu'il est préférable d'avoir un anticorps à haute affinité plutôt qu'une haute concentration d'anticorps dans l'immunsérum.

- par ailleurs, la sensibilité de l'analyse augmante avec la dilution de l'immunsérum. YALOW et BERSON ont montré que la sensibilité est maximum lorsque l'immunsérum est dilué de manière que $K.A_{c_o} = 0,5$ et que A_{g_o} tende vers 0 (A_{c_o} et A_{g_o} étant les concentrations à l'origine), c'est-à-dire que, en l'absence d'hormone non marquée et avec une concentration minimum d'hormone marquée, le rapport lié/libre soit d'environ 0,5.

Ces différentes relations entre l'affinité, la sensibilité et l'activité ont été recherchées dans le cas de nos immunsérums antiestriol.

I) AFFINITE DES IMMUNSERUMS

L'affinité des immunsérums a été appréciée par la détermination de plusieurs constantes caractéristiques.

1) Affinité de liaison, définie selon PEARLMAN et CREPY (1967)

PEARLMAN et CREPY (1967) ont mis au point une technique permettant de définir l'affinité de liaison d'une protéine pour un stéroïde par la mesure précise de la concentration de protéine totale nécessaire pour lier 50 % d'une quantité connue du stéroïde radioactif.

D'après DAUGHADAY (1958) et WESTPHAL (1961), l'affinité de liaison d'une protéine peut être exprimée par le produit :

$$(S_b/S_u)\ (1/P)$$

où S_b et S_u sont les concentrations de stéroïde lié et non lié, et où P est la concentration en protéines totales en g/l.

Quand $S_b/S_u = 1$, l'affinité de liaison est donc simplement représentée par la valeur de 1/P, en 1/g.

La technique de PEARLMAN et CREPY (1967) permettant de mesurer l'indice 1/P d'une protéine, est une technique de dialyse à l'équilibre. La protéine P et le stéroïde marqué S* sont incubés en quantités connues en présence d'un gel de séphadex G 25. L'équilibre est atteint par agitation pendant une heure à 25°C.

La protéine et le stéroïde lié restent dans la phase externe; le stéroïde libre se répartit entre les phases interne et externe

d'après son coefficient de partage K' mesuré en l'absence de protéines. La radioactivité de la phase externe "x" est mesurée. S_b et S_u de la phase externe sont alors calculés d'après S*, x et K'. Pour des quantités variées de protéine, il est ainsi facile de déterminer la concentration de protéines fixant 50 % du stéroïde. L'affinité de liaison de la protéine est alors donnée par le rapport 1/P, exprimé en litre/gramme.

La détermination du 1/P de nos différents immunsérums antiestriol représente la première application qui ait été faite de la méthode de PEARLMAN et CREPY à des anticorps. Elle a permis la définition d'un index supplémentaire de comparaison entre ces sérums. Les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau XX.

2) Constante d'association

Le terme 1/P représentant l'affinité de liaison d'une protéine pour un stéroïde, est relié à la constante d'association par l'équation définie par SCATCHARD (1949) :

$$(S_b/S_u)\ (1/P) = k(n - S_b/P).$$

où k est la constante d'association pour chaque site de liaison et n est le nombre de sites de liaison par molécule de protéines; P, S_b et S_u sont exprimés dans cette équation en concentration molaire.

La constante d'association a été mesurée pour chaque immunsérum antiestriol par la même technique de dialyse à l'équilibre que celle décrite plus haut, en faisant varier pour une même concentration de protéines, la quantité d'estriol radioactif. Le diagramme représentant les variations du rapport S_b/S_u en fonction de S_b est tracé. Pour une protéine pure, ce tracé est linéaire. Dans le cas des immunsérums antiestriol, une hyperbole a été obtenue pour chacun, prouvant l'existence de deux ou plusieurs protéines (dont vraisemblablement l'albumine donnant lieu à une liaison non spécifique). La méthode graphique de ROSENTHAL (1967) a permis d'éliminer la participation des protéines non spécifiques. La constante d'association k est alors donnée par la pente de la courbe. Le nombre de sites de liaison par gramme de protéines

TABLEAU XX

CARACTERISTIQUES D'AFFINITE ET DE SENSIBILITE DES IMMUNSERUMS ANTIESTRIOL

Sérums (semaine après début d'immunisation	1/P l/g	Ka.10^9	nM/g protéine sérique	Sensibilité pg	Titre
B 2038 (28è semaine)	150	0,9	$4,3.10^{-6}$	200	1/1600
L 1244 (32è semaine)	48	2,1	$0,02.10^{-6}$	25	1/700
L 1258 (32è semaine)	125	2,5	$0,08.10^{-6}$	25	1/2000
L 8393 (25è semaine)	180	2,4	$0,17.10^{-6}$	25	1/8000
L 8398 (32è semaine)	210	1,8	$0,14.10^{-6}$	50	1/2000
L 8401 (28è semaine)	260	2,7	$0,26.10^{-6}$	10	1/5000

1/P = indice d'affinité de liaison
Ka = constante d'association moyenne
n = nombre de sites de liaison par molécule de protéine
M = nombre de molécules par gramme de protéine

D'après SAVU et al. (1973)

totales peut également être déduit, connaissant la concentration en protéines totales de l'immunsérum (déterminée par la méthode de LOWRY et al. (1951), par la valeur de S_b lorsque S_b/S_u est nul.

Les différentes valeurs ainsi déterminées pour les six immunsérums antiestriol sont indiqués dans le tableau XX.
Les valeurs des constantes d'association peuvent être rapprochées de la valeur de 4.10^9 M^{-1} mesurée par Exley et al. (1971 $_1$) pour l'immunsérum anti-E_2-6-CMO.

II) SENSIBILITE DES IMMUNSERUMS

La sensibilité d'un immunsérum est définie dans ce travail comme étant la quantité minimum de stéroïde non marqué capable de provoquer un déplacement significatif ($\simeq$ 10 %) du stéroïde marqué lié à l'anticorps.

Dans ce paragraphe, nous étudions les courbes de déplacements obtenus avec divers immunsérums, ou avec un même immunsérum à divers temps de l'immunisation ou en présence de divers facteurs capables de modifier la sensibilité d'un immunsérum.

1) Courbes standard de radioimmunodosage pour les estrogènes

Une courbe standard pour l'estrone a été réalisée avec l'immunsérum antiestradiol-17β succinate 079-16 (Figure 15). La courbe présentée est la courbe moyenne résultant de 30 déterminations; les coefficients de variation vont de 4 % (au point 25 pg) à 14,5 % (au point 400 pg). Le déplacement de l'estrone-6,7-^{3}H lié à l'antisérum provoqué par 25 pg d'estrone non radioactive est significativement différent de zéro puisqu'il n'y a plus que 88,9 $\pm$ 3,9 % de traceur lié par rapport à la quantité d'estrone radioactive liée en l'absence d'estrone froide.

Des courbes standard pour l'estradiol ont été effectuées avec les deux immunsérums antiestradiol décrits; il n'a pas été possible de constater une différence significative dans la sensibilité de ces deux sérums pour l'estradiol, les courbes standard étant quasi superposables. Les coefficients de variation calculés après 30 déterminations successives de chaque point de la courbe varient de 3,7 % au point 25 pg à 20 % au point 400 pg. La

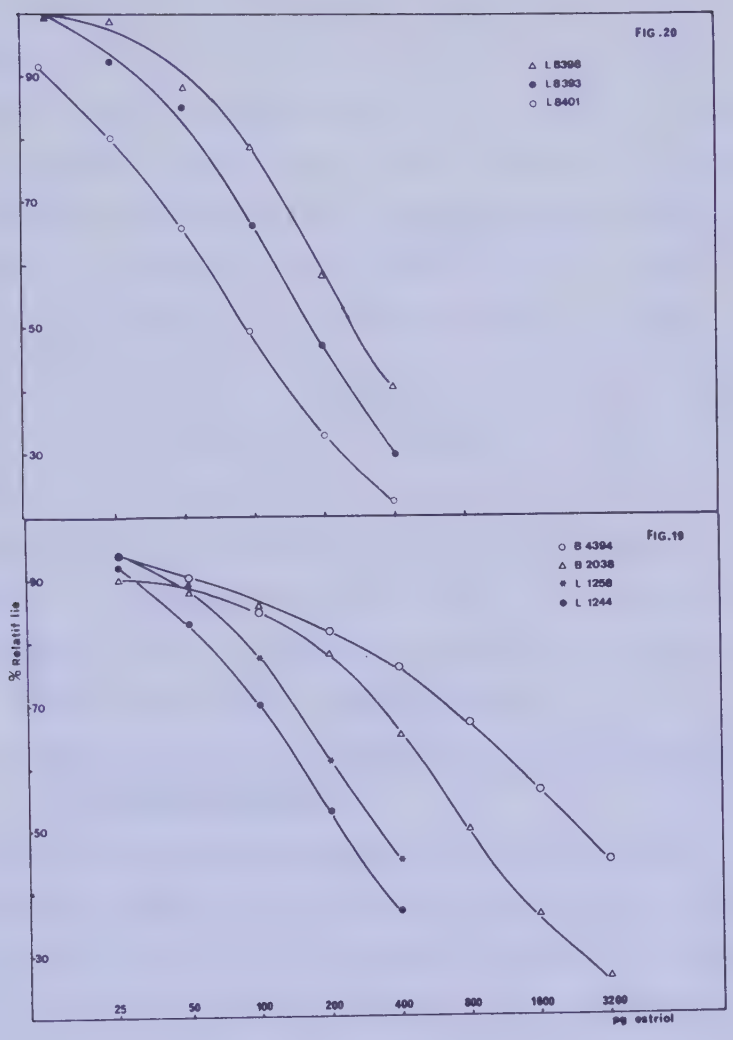


Fig. 19 et 20 Courbes standards de l'estriol réalisées

a) avec 4 immunsérums provenant de brebis(B) et de lapines(L) immunisées par voie sous-cutanée(1er procédé) (Fig.19)

b) avec les immunsérums de lapines immunisées par voie intradermique (2e procédé)(Fig.20)

sensibilité de ces immunsérums est très bonne puisque 25 pg d'estradiol provoquent déjà un déplacement de 19 % ± 3,0 de l'estradiol tritié fixé aux anticorps (Fig. 15).

Une courbe standard pour l'estriol a été effectuée avec chacun des sept immunsérums dont l'activité a été définie plus haut. Les courbes correspondantes sont présentées dans les figures 19 et 20. Parmi les immunsérums antiestriol, un seul, le sérum L 8401, présente une sensibilité particulièrement élevée (fig. 20); un déplacement de près de 10 % peut déjà être constaté en effet pour 10 pg d'estriol froid. Les autres sérums ne permettent pas de déterminer moins de 25 pg. Il semble particulièrement intéressant de noter que les deux sérums antiestriol produits chez des brebis ne permettent pas de distinguer moins de 200 pg, donc possèdent une sensibilité très médiocre (fig. 19). Il n'y a pas de différence significative sur le plan de la sensibilité entre les sérums obtenus par les deux techniques d'immunisation.

2) Evolution de la sensibilité des immunsérums au cours de l'immunisation

Nous avons constaté plus haut que le titre en anticorps des immunsérums produits par des animaux en cours d'immunisation croissait pendant quelques semaines jusqu'à un maximum, différent pour chaque animal, puis baissait assez rapidement. Il nous a paru intéressant de chercher si, en même temps que l'activité, la sensibilité de ces immunsérums augmentait au cours de l'immunisation. Nous avons fait cette étude sur trois des immunsérums antiestriol, dont un provenant d'une brebis et les deux autres provenant de lapines. Pour cela, nous avons réalisé des courbes standard pour l'estriol avec, pour chaque animal, les sérums prélevés à différentes étapes de l'immunisation.

Les déplacements obtenus avec les sérums prélevés chaque semaine entre les 12ème et 31ème semaines d'immunisation montrent une évolution progressive. Nous avons noté sur le tableau XXI les déplacements correspondant aux valeurs extrêmes.

TABLEAU XXI

MODIFICATION DES POURCENTAGES DE LIAISON DU TRACEUR EN CHAQUE POINT DE LA COURBE STANDARD POUR DES SERUMS PRELEVES AU DEBUT OU A LA FIN DE L'IMMUNISATION.

Immunsérum	B 2038		L 1244		L 1258	
Semaine après le début d'immunisation	12ème	31ème	12ème	31ème	12ème	31ème
pg d'estriol	% lié relatif					
12,5			102	97,5	98,2	92,5
25	99	100	100	94	91	87
50	100	97	97	85	81	75
100	97,5	95,5	91,5	74	63	61,5
200	96	89	78	52,5	50	45
400	89	77,5	54,5	35,5	36,5	31
800	81	63	36,5	23,5	26,5	22
1600	69	47,5	24	15,5	20	16
3200	56,5	36	15	11,5	15,5	14
Dilution du sérum	1/200	1/1500	1/200	1/1000	1/1000	1/4000
% lié pour 0 pg estriol	54	30	45	40,5	32	33

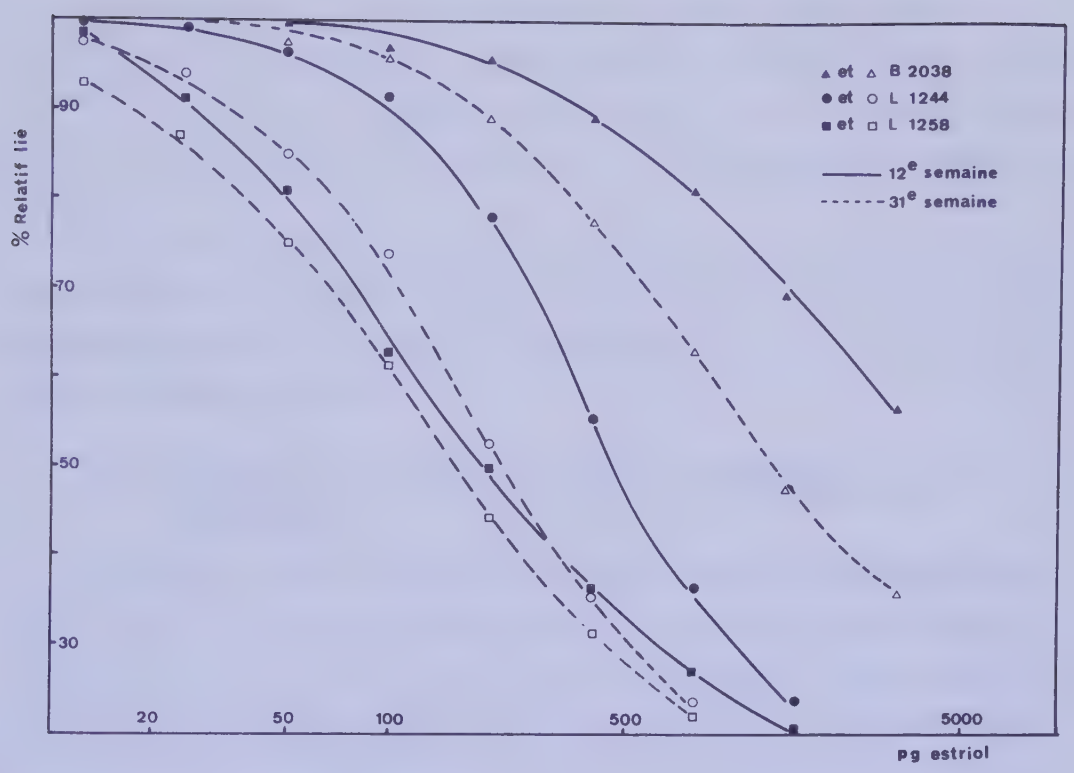


Fig. 21 Evolution de la sensibilité des immunsérums au cours de l'immunisation. Courbes standards de l'estriol réalisées avec trois immunsérums antiestriol prélevés à la 12^{e} et à la 31^{e} semaines de l'immunisation (représentation semi-logarithmique)

Il est évident d'après les chiffres cités dans ce tableau et d'après les courbes correspondantes représentées dans la figure 21, qu'il y a une nette amélioration de la sensibilité au cours de l'immunisation pour les animaux L 1244 et B 2038. Dans le cas de la brebis B 2038 par exemple, un même déplacement est obtenu pour 400 pg d'estriol à la 12ème semaine et pour 200 pg d'estriol à la 31ème semaine. Il semble, par contre, que le sérum produit par la lapine 1258 possède déjà à la 12ème semaine sa sensibilité maximum.

Il n'est donc pas possible de conclure de l'étude de ces trois sérums à une amélioration systématique de la sensibilité des immunsérums au cours de l'immunisation, bien que ce soit sans doute la règle générale.

3) Influence de la dilution de l'immunsérum sur la sensibilité.

BERSON et YALOW (1959) ont déjà signalé l'importance du choix de la dilution des immunsérums pour obtenir une bonne sensibilité. Nous avons étudié ce facteur pour l'estradiol et pour l'estriol. Les immunsérums antiestriol L 1244 et antiestradiol 079-16 ont été utilisés à différentes dilutions pour effectuer des courbes standard comparatives.

En fonction des différentes dilutions utilisées, nous avons noté sur le tableau XXII les pourcentages de liaison de l'estrogène marqué en l'absence de stéroïde non marqué puis en présence de concentrations croissantes de stéroïde froid.

Il est possible de constater l'amélioration dans la sensibilité des courbes standard lorsque, pour une quantité donnée de traceur, le pourcentage de liaison de ce traceur, en l'absence de stéroïde non marqué, est amené à une valeur inférieure à 70 % et supérieure à 10 %, par le jeu de la dilution de l'immunsérum (figure 22). En fait, nous avons constaté qu'il était préférable de ne pas se placer dans des conditions donnant un pourcentage de liaison supérieur à 60 % (manque de sensibilité) ou inférieur à 30 %

TABLEAU XXII

MODIFICATION DES POURCENTAGES DE LIAISON DU TRACEUR EN CHAQUE POINT DE LA COURBE STANDARD EN FONCTION DE LA DILUTION DES IMMUNSERUMS.

Immunsérum	Anti-estriol L 1244				Anti-estradiol O 79-16	
Dilutions des sérums	1/100	1/600	1/1000	1/2000	1/15000	1/30000
% lié pour O pg	71,5	56	40,5	9	86	50,4
pg estrogène	% lié relatif					
12,5	101,5	98,5	97,5	90,5	93	86
25	102	95,5	94	80,5	85	76
50	100,5	91,5	85	72	77	55
100	101	81	74	58	60	37
150					40	32
200	99,5	62,5	52,5	48	32	27
300					27	21
400	96	40	35,5	40,5		
800	84,5	25,5	23,5	35		
1600	60,5	16,5	15,5	31,5		
3200	36	11,5	11,5	34		

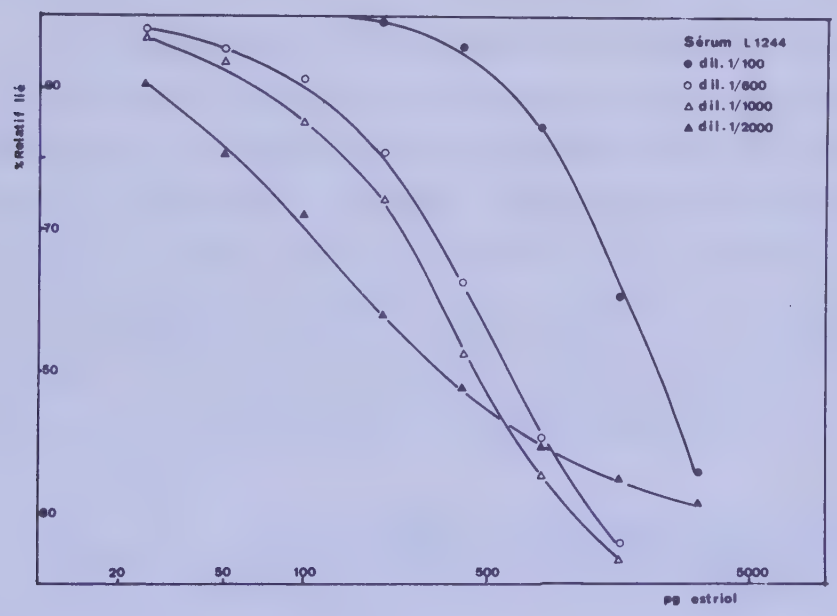


Figure 22 - Modification de la sensibilité des immunsérums en fonction de leur dilution. Courbes standard de l'estriol avec l'immunsérum L 1244 à différentes dilutions (représentation semi-logarithmique).

(trop grande imprécision). C'est pourquoi nous nous plaçons en général dans des conditions permettant 40 % de liaison du traceur en l'absence de stéroïde froid.

C) - SPECIFICITE DES IMMUNSERUMS

Les immunsérums anti-stéroïdes présentent dans la plupart des cas une spécificité remarquable vis-à-vis de l'haptène. Différents auteurs ont abordé le problème soulevé par cette spécificité (PRESSMAN et al. 1970; LIEBERMAN et al. 1959; EXLEY 1972, LINDNER et al. 1970, etc..)

Ce paragraphe est consacré aux problèmes de la spécificité des immunsérums : définition de cette spécificité d'une part, son évolution pour un même immunsérum au cours de l'immunisation d'autre part; enfin sa diversité pour des immunsérums obtenus à partir d'un même antigène.

I) DETERMINATION DE LA SPECIFICITE DES IMMUNSERUMS ANTIESTROGENES

1) Définition classique de la spécificité d'un immunsérum

La spécificité d'un immunsérum pour un stéroïde S vis-à-vis des autres stéroïdes X est en général démontrée par l'étude des courbes de réactions croisées représentant les déplacements du stéroïde S* marqué par des concentrations croissantes du stéroïde S non radioactif et des différents stéroïdes X également non radioactifs. ABRAHAM (1969) a défini, d'après ces courbes de réactions croisées, une équation exprimant mathématiquement un taux de réaction croisée (RC) pour chaque stéroïde X :

$$RC_{50\%} = \frac{\text{pg stéroïde S déplaçant 50\% traceur}}{\text{pg stéroïde X déplaçant 50\% traceur}} \times 100$$

2) Spécificité des immunsérums antiestradiol décrits

L'immunsérum de Caldwell obtenu à partir de 17β-estradiol-succinate et qui a été utilisé dans cette étude, a été testé par la méthode classique de détermination des taux de réactions croisées par WU et al. (1971). DRAY et al. (1971) ont testé de la même manière l'immunsérum antiestradiol obtenu à partir de 6-CMO-estradiol. Nous avons utilisé ces deux immunsérums dans notre travail. Les taux de réaction croisée de ceux-ci ainsi que ceux d'autres sérums analogues obtenus par différents auteurs (EXLEY et al. 1971; LINDNER et al. 1972; JEFFCOATE et SEARLE, 1972; DOERR, 1973) sont résumés dans le tableau XXIII.

Il apparait que les sérums obtenus à partir de 6-CMO-estradiol présentent une spécificité supérieure à celle des immunsérums obtenus à partir de dérivés en position 3 ou 17 de l'estradiol-17β.

JEFFCOATE (1971) a préparé un antigène dérivé de l'estrone et couplé en position 17 à l'albumine sérique humaine HSA. L'immunsérum résultant présentait des réactions croisées de 20 % avec l'estradiol, de 5,5 % avec l'estriol et inférieures à 1 % avec la progestérone, l'androstènedione et la DHA.

Pour cette étude, nous n'avons pas utilisé d'immunsérum spécifique de l'estrone et avons dosé cet oestrogène, après fractionnement chromatographique, par l'immunsérum anti-estradiol-17β-succinate de Caldwell.

3) Réactions croisées des stéroïdes avec les immunsérums antiestriol.

a) $RC_{50\%}$ de quelques estrogènes avec les immunsérums antiestriol.

La spécificité de trois des immunsérums antiestriol décrits a été définie de la manière classique exposée plus haut.
Les résultats sont donnés dans le tableau XXIV. Ces taux de réactions croisées ont été comparés à ceux obtenus par différents auteurs qui ont préparé des immunsérums antiestriol à partir de divers antigènes (Tableau XXV).

TABLEAU XXIII - TAUX COMPARATIFS DE REACTIONS CROISEES ($RC_{50\%}$) DES STEROIDES AVEC DES IMMUNSERUMS ANTIESTRADIOL DERIVANT DE DIFFERENTS ANTIGENES

Antigène	Estradiol-3 ou -17-succinate			Estradiol-6-CMO			
Auteur	WU° 1971	LINDNER 1972	DOERR 1973	DRAY° 1971	EXLEY 1971	LINDNER 1972	JEFFCOATE 1972
Stéroïde							
Estradiol	100	100	100	100	100	100	100
6-oxo-estradiol				12,3			
16-oxo-estradiol			1,5	1,3			4,0
Estradiol-17α	5,1	60	33,0	0,88	2,0	1,0	1,0
Estradiol-3-méthyléther	0,2		13,0				10,0
2-méthoxyestradiol	0,05		0,1	0,09			4,0
Estradiol-17β-glucosiduronate				0,38			
17-éthynylestradiol	6,7						
17-éthynylestradiol-3-méthylether	0						
Estrone	63,7	100	66,0	0,7	0,9	4,6	0,9
16α-hydroxyestrone	2,6		3,5	0,42			
2-hydroxyestrone	1,3						
2-méthoxyestrone	0			0			
1-méthylestrone	0,6						
Estrone-3-méthyléther	0,2						
Estrone-3-éthyléther	0,7						
Estrone sulfate				0			
Estriol	18,7	10	6,4	0,52	1,0	0,4	0,4
16-épiestriol	1,6		3,7	0			0,4
17-épiestriol	3,3			0			
16,17-épiestriol	3,3			0			
Estriol-3-méthylether	0,03						
Equiline			20,0		0,6		0,05
Equilénine			29,0		0,2		0,05
Testostérone	0			0			
Progestérone	0			0			

° Immunsérums anti-estradiol utilisés dans cette étude.

TABLEAU XXIV

TAUX DE REACTION CROISEE ($RC_{50\%}$) DES STEROIDES PHENOLIQUES AVEC 3 DES IMMUNSERUMS ANTIESTRIOL ETUDIES

Stéroïde	Sérum L 1244	L 1258	B 2038
Estriol	100	100	100
Estrone	0	0	0
Estradiol	0	0,28	1,00
16-épiestriol	0,1	1,00	1,42
17-épiestriol	0,1	0,11	0
16,17-épiestriol	0	0	0
15α-hydroxyestriol	0,54	5,60	
16α-hydroxyestrone	0,10	0,37	0

TABLEAU XXV

TAUX DE REACTION CROISEE ($RC_{50\%}$) DES ESTROGENES AVEC LES IMMUNSERUMS ANTIESTRIOL DECRITS DANS LA LITTERATURE

Antigène	Estriol-16,17-DHS-BSA	Estriol-3,16,17-TS-HSA	Estriol-6-CMO-BSA
Auteur	WILSON, 1972	TULCHINSKY,1971	WILSON,1972
Estrogène			
Estriol	100	100	100
Estrone	60	110	2
Estradiol	60	140	2
16-épiestriol		100	17
17-épiestriol		20	
16,17-épiestriol		16	
16-oxoestradiol			15
16α-hydroxyestrone		0,.	6
Estriol-3-méthyléther		0,01	

DHS = dihémisuccinate; TS = trisuccinate

La spécificité des immunsérums L 1244, L 1258 et B 2038 semble particulièrement remarquable par rapport à celle des autres immunsérums cités et même par rapport à celle de l'immunsérum préparé par LINDNER (1972) à partir du 6-CMO-estriol-BSA également et dont les taux de réactions croisées ont été indiqués par WILSON (1972).

b) Vérification de la spécificité par influence de surcharges de stéroïdes compétitifs.

L'excellente spécificité des immunsérums antiestriol dont nous disposions nous a conduits tout naturellement à vouloir les utiliser pour la détermination de l'estriol dans des extraits biologiques bruts. Outre l'estriol, de nombreux stéroïdes existent dans de tels extraits et notamment, parmi les phénolstéroïdes, l'estrone et l'estradiol peuvent se trouver en quantités inférieures, égales ou même dix fois supérieures à celle de l'estriol. Il nous a donc paru raisonnable de vérifier si la garantie apportée par la valeur des taux de réactions croisées était absolue dans de telles conditions (de LAUZON et al., 1973 1).

C'est ainsi que nous avons été amenés à réaliser des courbes standard de l'estriol par radioimmunodosage et en présence de quantités arbitraires d'estrogènes physiologiques. Ces essais ont été réalisés avec les deux immunsérums de lapines L 1244 et L 1258. Les estrogènes compétitifs choisis étaient l'estrone, l'estradiol et le 15α-hydroxyestriol. Deux types de vérification ont été réalisés :

- La première expérience a consisté à ajouter à chaque concentration d'estriol
  - o une même quantité du stéroïde compétitif
  - o une quantité de ce stéroïde dix fois supérieure à celle de l'estriol.
- La deuxième expérience consistait à ajouter à une concentration constante de la gamme, des quantités croissantes du stéroïde compétitif.

Les courbes résultant de ces essais ont été comparées aux courbes standard normales de l'estriol avec les deux sérums

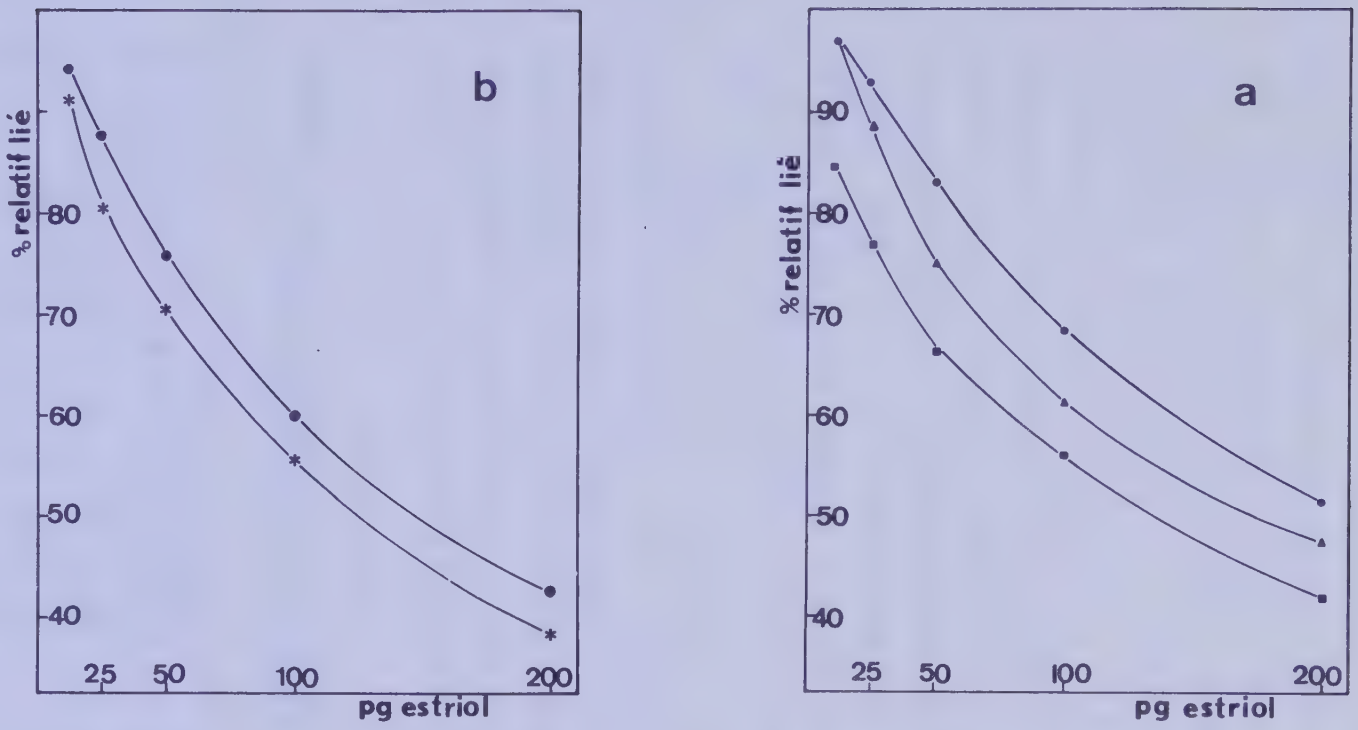


FIG.23 Courbes Standards de radioimmunodosage de l'estriol. 100% lié à 0pg représente effectivement 40% d'estriol radioactif lié.

a Antisérum L 1258 (dil. 1/3000). Cet essai a été effectué 1) sans stéroide compétitif(●—●)
2) avec des quantités égales d'estradiol (▲–▲)
3) avec des quantités dix fois supérieures d'estradiol (■–■)

b Antisérum L 1244 (dil.1/1200). 1) La même courbe a été obtenue sans compétiteur, avec des quantités égales ou dix fois supérieures d'estradiol, avec des quantités égales de 15α-hydroxyestriol (●–●)
2) La courbe (∗–∗) a été obtenue en présence de doses dix fois supérieures de 15α-hydroxyestriol.

(figures 23 et 24).

Ces expériences font apparaître des spécificités différentes pour les deux immunsérums testés. Cette différence n'avait pas été mise en évidence par l'étude des taux de réaction croisée. La figure 23a permet de constater l'importante modification du pourcentage de liaison de l'estriol tritié avec le sérum L 1258 lorsque des concentrations égales ou supérieures d'estradiol sont ajoutées à l'estriol non marqué (l'erreur peut atteindre 100 % lorsque la concentration d'estradiol est dix fois supérieure à celle de l'estriol). Par contre, l'estradiol ne semble pas interférer lors de la détermination de l'estriol avec l'immunsérum L 1244 (fig. 23b). Le 15α-hydroxyestriol provoque cependant un abaissement non négligeable du pourcentage de liaison de l'estriol tritié lorsqu'il est ajouté en quantités dix fois plus grandes que celles de l'estriol.

La figure 24 montre l'effet de concentrations croissantes d'estrone et d'estradiol sur le déplacement du traceur provoqué par 200 pg d'estriol. Dans le cas de l'immunsérum L 1258, l'erreur apportée par addition de 50 pg d'estradiol atteint 30 %; dans les mêmes conditions expérimentales, aucune erreur n'est perceptible avec le sérum L 1244 (figure 24 ; tableau XXVI).

TABLEAU XXVI

ERREURS DANS LA DETERMINATION DE L'ESTRIOL EN PRESENCE DE DE QUANTITES CROISSANTES D'ESTRADIOL.

Estradiol ajouté pg	Sérum L 1258			Sérum L 1244		
	% lié	pg mesurés	Erreur %	% lié	pg mesurés	Erreur %
0	67	200	0	54	200	0
50	62	260	30	54	200	0
500	57	320	60	54	200	0
5000	50	440	120	54	200	0

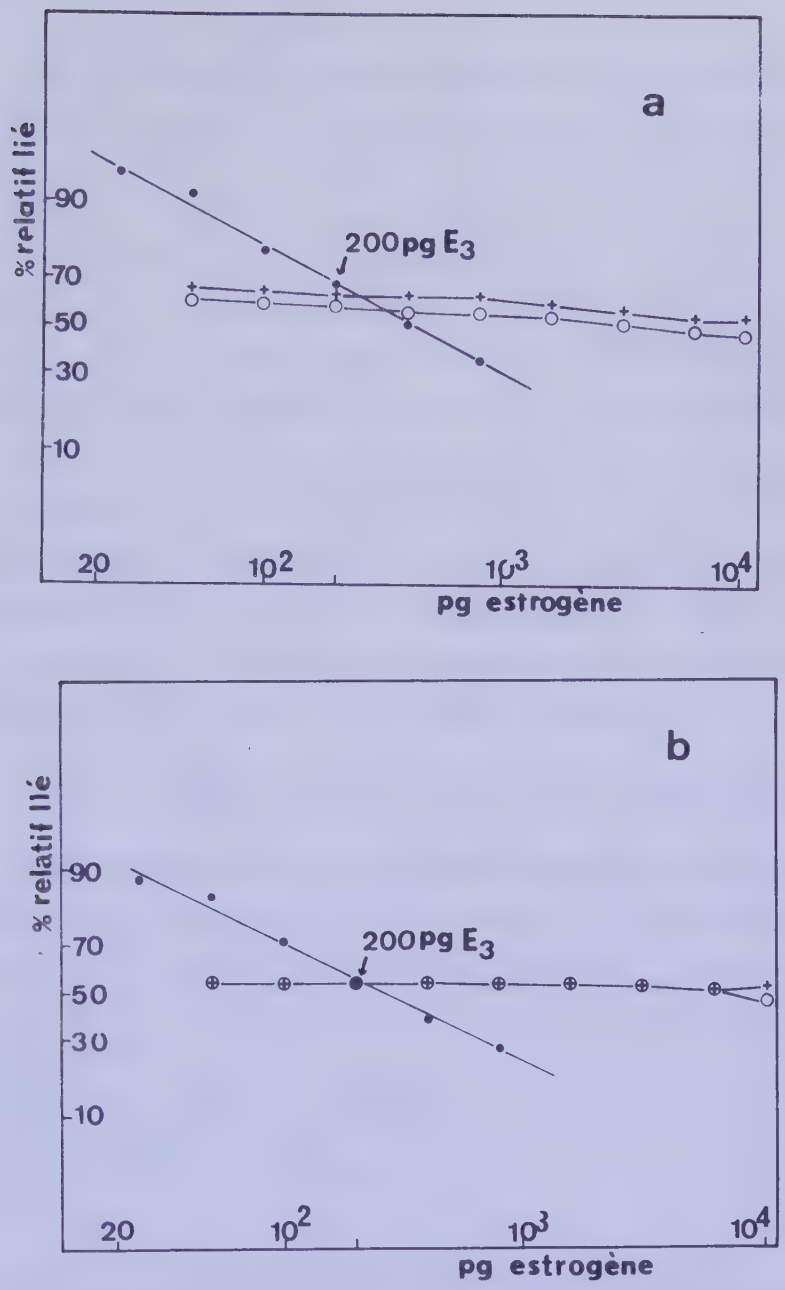


FIG. **24** Représentation logit-log du radioimmunodosage de l'estriol avec les immunsérums L 1258 (fig **a**)(dil. 1/1800 donne 55% d'estriol radioactif liés à 0 pg) et L 1244 (fig. **b**)(dil. 1/1000 donne 50% d'estriol radioactif liés pour 0 pg).

●-● représente la courbe standard d'estriol
+ – + représente des surcharges croissantes d'estrone à 200 pg d'estriol
○-○ représente des surcharges croissantes d'estradiol à 200 pg d'estriol.

Les résultats des deux dernières expériences reportées ne rejoignent pas les conclusions tirées de la détermination des taux de réactions croisées : des sérums dont la spécificité semblait équivalente par l'étude des réactions croisées se révèlent très différents après étude de courbes standard avec surcharges; d'autre part, un stéroïde X , dont le taux de réaction croisée ($RC_{50\%}$) est nul, est capable à forte concentration d'induire une erreur pouvant atteindre 100 % sur la détermination de S.

Ce dernier fait pourrait s'expliquer en partie par le fait qu'un déplacement du traceur S de son complexe avec l'anticorps par un stéroïde interférant X n'est souvent obtenu que pour des quantités très fortes de X alors que de faibles quantités du même stéroïde X peuvent provoquer un déplacement sans doute inférieur à 50 % mais loin d'être négligeable.

c) $RC_{1\ ng}$ des stéroïdes avec les immunsérums antiestriol.

Les différentes conclusions auxquelles les expériences réalisées ont abouti nous ont amenés à rechercher un nouveau test de spécificité, reflètant d'aussi près que possible la réalité physiologique. Les données de la littérature ainsi que notre propre expérience concernant les taux de stéroïdes dans les liquides biologiques, nous ont conduits à la définition d'un taux de réaction croisée : $RC_{1\ ng}$*

$$RC_{1\ ng} = \frac{\%\text{ traceur déplacé par 1 ng X}}{\%\text{ traceur déplacé par 1 ng S}} \times 100$$

---

* Il faut noter que 1 ng représente dans notre cas une dose de S qui déplace au maximum le traceur. Dans les cas où ce même déplacement maximum est obtenu pour une concentration "a ng" différente de 1, un taux de réaction croisée $RC_{a\ ng}$ peut être déterminé de façon analogue :

$$RC_{a\ ng} = \frac{\%\text{ traceur déplacé par a ng X}}{\%\text{ traceur déplacé par a ng S}} \times 100$$

Par cette méthode, les taux de réactions croisées, $RC_{1\ ng}$ ont été déterminés avec chaque immunsérum antiestriol étudié pour une série de stéroïdes phénoliques (tableau XXVII) et non phénoliques (XXVIII). Aucune réaction croisée significative n'a pu être constatée pour aucun des immunsérums avec les stéroïdes non-phénoliques. Parmi les estrogènes testés, quelques-uns donnent des réactions croisées nulles, ou très faibles avec chaque immunsérum : ce sont la 17-desoxoestrone et l'estra-1,3,5(10)triène, les 2-hydroxy- et 2-méthoxy-estrone, le sulfate d'estrone ainsi que les différents acétates d'estradiol et d'estriol. Les autres stéroïdes phénoliques donnent lieu à des différences considérables dans les taux de réaction croisée suivant l'immunsérum considéré. Deux stéroïdes, par exemple, se distinguent notablement : le 16,17-épiestriol possède des taux de réaction pratiquement nuls avec chaque immunsérum sauf avec le sérum L 8393 ($RC_{1\ ng}$ = 14 %); de même, la 6α-hydroxyestrone donne une réaction croisée de 22,8 % avec le sérum L 1258 alors que les taux sont pratiquement nuls avec les autres sérums.

Par cette définition des taux de réactions croisées, il semble que l'immunsérum L 1258 soit le moins spécifique du lot d'immunsérums étudiés, les taux $RC_{1\ ng}$ pour ce sérum étant beaucoup plus importants que les taux $RC_{50\ \%}$ déterminés plus haut : ainsi, l'estradiol, l'estrone et le 15α-hydroxyestriol qui avaient des taux $RC_{50\%}$ respectivement de 0,28-0 et 5,6 (tableau XXIV) présentent ici des taux $RC_{1\ ng}$ de 34, 16 et 49 %. (tableau XXVII).

Les autres sérums antiestriol présentent des degrés très variés de spécificité avec les différents phénolstéroïdes; seul le sérum L 1244 se distingue par des taux de réaction croisée particulièrement faibles : les 3-éthyl et 3-méthyl éthers de l'estriol, les 6-oxo- et 6-CMO-estriol, le 15α-hydroxyestriol ainsi que deux estrogènes de synthèse sont les seuls stéroïdes donnant des taux de réaction croisée non négligeables avec cet immunsérum.

TABLEAU XXVII

TAUX DE REACTION CROISEE ($RC_{1\ ng}$) DES STEROIDES PHENOLIQUES AVEC 3 IMMUNSERUMS ANTIESTRIOL

STEROIDES	B 2038	L 1244	L 1258
1,3,5(10)-Estratriene-3,16α,17β-triol (estriol)	100,0	100,0	100,0
1,3,5(10)-Estratriene-3,16β,17β-triol (16-epiestriol)	12,0	0	29,0
1,3,5(10)-Estratriene-3,16α,17α-triol (17-epiestriol)	4,0	0	14,0
1,3,5(10)-Estratriene-3,16β,17α-triol (16,17-epiestriol)	0	0	0
1,3,5(10)-Estratriene-3,17β-diol (estradiol)	12,0	0	34,0
1,3,5(10)-Estratriene-3,17α-diol(17α-estradiol)	0	0	7,0
1,3,5(10)-Estratriene-3,16α-diol (16α-estradiol)	16,8	1,8	21,9
1,3,5(10)-Estratriene-3,16β-diol (16β-estradiol)	6,5	0,6	12,9
3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one (estrone)	6,0	0	16,0
3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-16-one (16-estrone)	0	0	12,4
1,3,5(10)-Estratriene	1,9	0	0
1,3,5(10)-Estratrien-3-ol (17-desoxoestrone)	0	0	5,7
1,3,5(10)-Estratriene-3,15α,16α,17β-tetrol (15α-hydroxyestriol)	25,0	14,0	49,0
1,3,5(10)-Estratriene-3,6α,17β-triol (6α-hydroxyestriol)	29,0	4,9	37,4
1,3,5(10)-Estratriene-3,7α,17β-triol (7α-hydroxyestriol)	0	0	21,6
2,3-Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one (2-hydroxyestrone)	0	0	3,8
3,6α-Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one (6α-hydroxyestrone)	0	0	22,8
3,16α-Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one (16α-hydroxyestrone)	7,0	0	29,0
3,16α,17β-Trihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-6-one (6-oxoestriol)	117,0	73,0	94,0
3,17β-Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-6-one (6-oxoestradiol)	29,0	1,9	41,0
3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratriene-16,17-dione (16-oxoestrone)	4,0	0	18,3

TABLEAU XXVII (Suite)

STEROIDES	B 2038	L 1244	L 1258
2-Methoxy-1,3,5(10)-estratriene-3,17β-diol (2-methoxy estradiol)	0	0	15
3-Hydroxy,2-methoxy-1,3,5(10)estratrien-17-one (2-methoxy estrone)	0	0,6	3,1
3-Methoxy-1,3,5(10)estratriene-16α,17β-diol (estriol 3-methyl ether)	58,0	66,0	33,0
3-Methoxy-1,3,5(10)-estratriene-16β,17β-diol (16-epiestriol 3-methylether)	20,6	0	13,5
3-Ethoxy-1,3,5(10)-estratriene-16α,17β-diol (estriol 3-ethyl ether)	100	82,0	38,6
16α-Hydroxy,3-methoxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one	10,0	0	21,0
16α-Hydroxy,3-ethoxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one	11,0	0	9,4
17-Dimethoxy,3-ethoxy-1,3,5(10)-estratrien-16α-ol	5,6	0,6	11,0
3-Methoxy-1,3,5(10)-estratrien-17β-ol (estradiol 3-methyl ether)	18,0	0	21,0
17β-Hydroxy,3-methoxy-1,3,5(10)-estratrien-16-one	0	0	2,6
3-Methoxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one (estrone 3-methyl ether)	9,0	0	6,0
1,3,5(10)-Estratriene-3,16α,17β-triacetate (estriol triacetate)	0	0	0
3,16α-Diacetoxy-1,3,5(10)-estratrien-17β-ol	0	0,6	7,0
3,16α,17β-Triacetoxy-1,3,5(10)-estratrien-6-one	0	0	0
16α,17β-Diacetoxy-1,3,5(10)-estratriene-3-methyl ether	4,0	0	1,0
3-Methoxy,16α-acetoxy-1,3,5(10)-estratrien-17β-ol	1,9	1,2	0,6
1,3,5(10)-Estratriene-3,17β-diacetate (estradiol diacetate)	1,0	0	2,0
17β-Acetoxy-1,3,5(10)-estratriene-3-methyl ether	0	0	0
3-Acetoxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one (estrone acetate)	11,0	0,6	11,0
6-Carboxymethyloxime-1,3,5(10)estratriene-3,16α,17β-triol (estriol-6-CMO)	106,9	59,0	99,7
3,17-Dihydroxy,19-nor-(17α)-pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne (ethynylestradiol)	27,9	16,2	14,3

TABLEAU XXVIII

TAUX DE REACTION CROISEE ($RC_{1\ ng}$) DES STEROIDES NON PHENOLIQUES AVEC 3 IMMUNSERUMS ANTIESTRIOL

STEROIDES	B 2038	L 1244	L 1258
Cholestane	0	1,2	0
Cholest-5-en-3β-ol (cholesterol)	4,0	0	0
11β,17α,21-Trihydroxy-pregn-4-ene-3,20-dione (cortisol)	0	0,6	3,1
17α,21-Dihydroxy-pregn-4-ene-3,11,20-trione (cortisone)	0	0	0
5β-pregnane-3α,11β,17α,20α,21-pentol (cortol)	0	0	0
3α,17α,20α,21-Tetrahydroxy-5β-pregnan-11-one (cortolone)	0	0	0
3α,17α,21-Trihydroxy-5β-pregnan-20-one (tetrahydrocortexone)	1,0	0	1,3
3α,11β,17α,21-Tetrahydroxy-5β-pregnan-20-one (tetrahydrocortisol)	0	0	0
3α-Hydroxy-5β-pregnan-20-one (pregnanolone)	0	0	0
3β-Hydroxy-pregn-5-en-20-one (pregnenolone)	0	0	0
5β-Pregnane-3α,20α-diol (pregnanediol)	0	0	0
5β-Pregnane-3α,17α,20α-triol (pregnanetriol)	0	0	1,0
Pregn-4-ene-3,20-dione (progesterone)	0	0	1,9
3β-Hydroxy-androst-5-en-17-one (DHA)	0	0	0
3α-Hydroxy-5α-androstan-17-one (androsterone)	0	0,6	0
3α-Hydroxy-5α-androstane-11,17-dione (11-oxo-androsterone)	0	0	0
3α-Hydroxy-5β-androstane-11,17-dione (11-oxo-etiocholanolone)	0	2,0	1,9
3α,11β-Dihydroxy-5α-androstan-17-one (11-hydroxy androsterone)	0	0	0,6
3α,11β-Dihydroxy-5β-androstan-17-one (11-hydroxy etiocholanolone)	0	0	0
3α-Hydroxy-5β-androstan-17-one (etiocholanolone)	0	0	5,1
5β-Androstane-3β,17β-diol (etiocholanediol)	5,0	0	0,1
5α-Androstane-3β,17β-diol (androstanediol)	0	0	4,0

Parmi ces derniers stéroïdes, seul, le 15α-hydroxyestriol est un stéroïde naturel mais nous avons vu qu'il ne pouvait interférer dans la détermination de l'estriol par radioimmunodosage que s'il se trouvait en quantités dix fois supérieures à celle de l'estriol (Figure 23b).

La remarquable spécificité de l'antiestriol L 1244 comparée à celle des autres immunsérums nous a amenés à nous demander d'une part, s'il était possible en purifiant un immunsérum peu spécifique, d'augmenter sa spécificité, d'autre part, quelle était l'origine de telles différences dans le degré de spécificité de plusieurs immunsérums obtenus à partir d'un même antigène. Nos tentatives de réponse à ces deux questions sont exposées dans les deux paragraphes suivants.

4) Purification d'un immunsérum antiestriol

De nombreux auteurs purifient les antisérums dont ils disposent en les épuisant par la BSA (élimination des anti-BSA présents dans les immunsérums) et par le rivanol (élimination de toutes les protéines différentes des gamma-globulines).

Nous avons, de notre côté, comparé deux techniques d'isolement des gamma-globulines. Par ailleurs, nous avons tenté d'éliminer, dans un immunsérum anti-estriol, la fraction d'anticorps possèdant une affinité pour l'estradiol en saturant l'immunsérum par le 6-CMO-estradiol-BSA. Ces différents procédés ont été appliqués à l'immunsérum anti-estriol L 1258.

a) Traitement par le rivanol

La méthode appliquée est celle décrite par THORNEYCROFT et al. (1970) et ABRAHAM (1969). Le sérum (1 ml) est additionné de 4 ml d'une solution aqueuse de rivanol (6,9-diamino-2-ethoxyacridine lactate-H_2O) à 0,4 % puis laissé 30 min. à température ambiante. Le rivanol en excès est éliminé par addition de norite A jusqu'à disparition de la coloration jaune. Le mélange est centrifugé et

la fraction gamma-globuline purifiée, décantée puis conservée au froid.

b) Précipitation des globulines par sulfate d'ammonium

Le sérum est dilué cinq fois par de l'eau physiologique, puis additionné d'une quantité telle d'une solution de sulfate d'ammonium saturée que la concentration finale de ce dernier soit de 40 % (p/v). Les gamma-globulines précipitent pendant 24 heures à 4°C. Le précipité est recueilli après centrifugation puis redissous dans un volume déterminé de tampon phosphate pH 7 (2,5 fois le volume de sérum de départ). L'excès de sels accompagnant les globulines est alors éliminé par dialyse dans le tampon pendant 48 heures à 4°C.

c) Saturation de l'immunsérum par le conjugué estradiol-6-CMO-BSA

Sur des fractions identiques de 0,5 ml d'immunsérum L 1258 purifié par le sulfate d'ammonium, sont ajoutés respectivement 2 - 1 - 0,5 et 0,1 mg d'estradiol-6-CMO-BSA. L'incubation est réalisée une heure à 37°C puis 48 heures à 4°C. Les tubes sont alors centrifugés; la fraction du conjugué estradiol donnant lieu au précipité le plus important permet de déterminer la quantité optimum de conjugué nécessaire pour épuiser la fraction gamma-globuline des anticorps anti-estradiol.

d) Qualités immunologiques des sérums purifiés

L'activité, la sensibilité et la spécificité des immunsérums non purifiés et purifiés par les différents traitements décrits ont été comparées pour l'immunsérum L 1258. Les résultats sont indiqués dans le tableau XXIX.

Les courbes standard de l'estriol résultant des différentes fractions purifiées sont présentées dans la Figure 25.

TABLEAU XXIX

QUALITES IMMUNOLOGIQUES DE L'IMMUNSERUM L 1258 BRUT OU PURIFIE PAR DIFFERENTES METHODES

Traitement	(-)	Rivanol	$(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)_2SO_4$ + 6-CMO-E_2
Titre	1/2000	1/1200	1/600	1/50
$RC_{1\ ng\ estradiol}$	32,8	33,7	31,7	10,4
Courbe standard / pg estriol	% relatif d'estriol tritié lié			
25	88,5	86,3	95,0	94,0
50	78,5	75,0	85,0	88,5
100	62,0	58,0	65,5	79,0
200	48,5	44,0	53,5	76,5

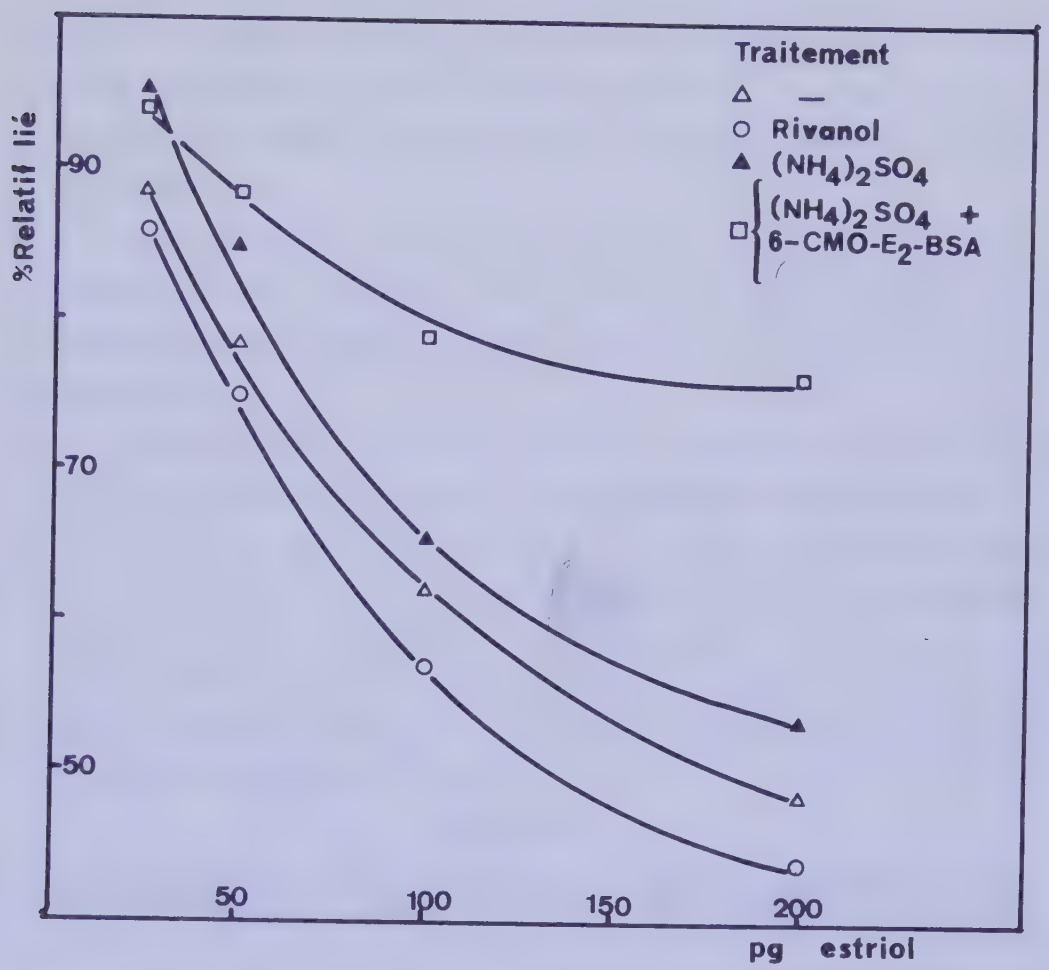


Figure 25 - Modification de la sensibilité par purification d'un immunsérum. Courbes standard pour l'estriol, réalisées avec l'immunsérum L 1258 non purifié ou purifié par différents traitements.

Il semble donc d'après les chiffres indiqués que les traitements de purification et particulièrement la saturation par un dérivé stéroïde couplé à la BSA altèrent notablement l'activité des immunsérums.

Les courbes standard ne sont pas modifiées de façon importante. Seul, le sérum traité par le 6-CMO-estradiol-BSA semble avoir perdu une grande partie de sa sensibilité. Le traitement par le rivanol se traduit par une légère augmentation de sensibilité du sérum.

Les taux de réaction croisée de l'estradiol avec ces différents sérums ne sont modifiés que dans le cas du traitement par le 6-CMO-estradiol-BSA à la suite duquel la spécificité est nettement améliorée.

Par ailleurs, afin de vérifier l'amélioration de spécificité apportée par les méthodes de purification décrites pour la détermination de l'estriol dans un liquide biologique, nous avons dosé l'estriol dans un extrait organique brut de sérum en fin de grossesse, par les différents immunsérums indiqués sur le tableau XXX. Les taux obtenus ont été comparés à celui trouvé après fractionnement des stéroïdes du même extrait sérique sur colonne de séphadex LH 20.

TABLEAU XXX

TAUX D'ESTRIOL DANS UN SERUM DE GROSSESSE, DETERMINES PAR RADIOIMMUNODOSAGE AVEC DIFFERENTS IMMUNSERUMS ANTIESTRIOL.

Immunsérums	Taux d'estriol (moyenne de 2 déterminations) - pg/ml	
	Extrait sérique brut	Extrait fractionné
L 1244	8550	9025
L 1258 non purifié	19720	9025
L 1258 purifié :		
- par rivanol	18920	9025
- par $(NH_4)_2SO_4$	15155	9025
- par $(NH_4)_2SO_4$ et 6-CMO-E_2-BSA	10820	9025

D'après tous les résultats indiqués et notamment les différents taux d'estriol trouvés dans un même sérum par les différents immunsérums, il semble qu'aucun système de purification n'apporte une solution idéale au problème de la spécificité. Les essais de purification n'apportent que peu de modification dans les critères de spécificité. Dans le cas de l'épuisement par l'antigène anti-estradiol, l'amélioration de la spécificité s'accompagne d'une perte drastique de sensibilité et donc ne permet pas de conclure à une généralisation du procédé. A moins de disposer d'un immunsérum naturellement de très haute spécificité, tel que le sérum L 1244, il semble impossible d'éviter pour les extraits biologiques à doser, un fractionnement sur colonne de sephadex.

5) Hétérogénéité et relations structurales

L'hypothèse soulevée par PRESSMAN et GROSSBERG (1970 a et b) et reprise par différents auteurs concernant l'hétérogénéité limitée des immunsérums nous avait amenés à tenter de supprimer toute réaction croisée d'un stéroïde X compétitif en faisant adsorber par le sérum anti-S une quantité maximale du conjugué X-BSA. D'après cette théorie de l'hétérogénéité, un immunsérum serait constitué en fait d'un assemblage de différents types de gamma-globulines ayant des configurations particulières. La production chez un animal de molécules d'anticorps de configuration très différente, pourrait être expliquée de la façon suivante : parmi toutes les cellules capables de réagir dans l'animal immunisé avec l'haptène introduit, seules, quelques-unes sont stimulées pour produire des anticorps; suivant le type de cellules stimulées, le nombre et la nature des molécules d'anticorps formés peuvent différer non seulement d'un animal à l'autre, mais également chez un même animal.

Ainsi, dans le cas des estrogènes, plusieurs structures sont déterminantes dans la production des anticorps et dans la reconnaissance ultérieure des stéroïdes par les anticorps :

- le noyau benzènique planaire joue un rôle probablement prépondérant dans la reconnaissance d'un estrogène, par rapport au noyau saturé des autres stéroïdes.

- les groupements méthyl angulaire et phénolique, les fonctions hydroxyle et cétone peuvent également être déterminants pour la reconnaissance par une population particulière d'immunoglobulines.

Le grand nombre de réactions croisées testées avec nos immunsérums anti-estriol nous ont permis d'aborder le problème liant la stéréochimie à la spécificité des immunsérums. Parmi les stéroïdes phénoliques dont les taux de réactions croisées ont été déterminés , quelques caractéristiques structurales essentielles les distinguent de l'estriol : ce sont :

- soit une orientation différente des fonctions alcooliques (épi-estriol....)

- soit l'absence de l'une de ces fonctions (estradiol, 17-desoxoestrone....)

- soit la substitution de l'une de ces fonctions (16α-hydroxy-estrone .....)

- soit,enfin, l'addition d'une nouvelle fonction (15α-hydroxy-estriol....).

Considérant les réactions croisées des stéroïdes d'après ces différences structurales, il en résulte que le facteur le plus important semble être l'absence de l'une des fonctions caractéristiques. Il est ainsi possible de constater une perte progressive de réactivité immunologique avec le 15α-hydroxy-estriol, l'estradiol-17β, la 17-desoxoestrone et enfin, le 1,3,5(10)-estratriène.

Du point de vue encombrement stérique, la position où joue cet encombrement est un facteur important : alors que toute modification stérique dans le noyau D est conséquente, la même modification dans le noyau A est déjà beaucoup moins grave; elle est pratiquement insignifiante lorsqu'elle intervient dans le noyau B.

Un changement dans l'orientation des groupements fonctionnels se traduit également par une diminution de la réactivité immunologique : ainsi, les estrogènes substitués en 17α sont beaucoup moins compétitifs vis-à-vis de l'estriol, que les estrogènes substitués en 17β.

Des relations plus précises entre stéréochimie et spécificité pourraient être déduites si de nombreux autres types d'antigènes, d'anticorps et de stéroïdes pouvaient être testés de la même manière et si une purification, plus satisfaisante que celle décrite, de la fraction gamma-globuline pouvait être obtenue.

6) Evolution de la spécificité au cours de l'immunisation

D'après l'hypothèse de PRESSMAN (1970) que nous avons exposée dans le paragraphe précédent, les anticorps formés au cours de l'immunisation deviendraient de moins en moins hétérogènes. C'est-à-dire qu'une durée prolongée du temps d'immunisation devrait augmenter les chances de prédominance progressive d'un groupe particulier de cellules avec homogénéisation consécutive des anticorps formés.

Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse avec les immunsérums anti-estriol : le taux de réaction croisée $RC_{1\ ng}$ de l'estradiol a été déterminé avec les sérums de la brebis B 2038 et des lapines L 1244 et L 1258 prélevés à différentes étapes de l'immunisation. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XXXI. Sur ce tableau figurent également les valeurs des déplacements relatifs de l'estriol tritié par l'estradiol pour chaque sérum testé; ceci permet en effet de tenir compte, dans l'appréciation de la spécificité, de l'évolution simultanée de la sensibilité de l'immunsérum. Les chiffres indiqués ne permettent pas de conclure à une évolution significative de la spécificité des immunsérums au cours de l'immunisation : les taux de réaction croisée de l'estradiol sont plus faibles à la fin de l'immunisation. Cependant, dès la 12ème semaine, une différence considérable

TABLEAU XXXI

EVOLUTION DE LA SPECIFICITE AU COURS DE L' IMMUNISATION

Semaines d'immunisation	Immunsérums L 1258			L 1244			B 2038		
	% traceur lié avec 1 ng E_2	% traceur lié avec 1 ng E_3	$RC_{1\ ng}$	% traceur lié avec 1 ng E_2	% traceur lié avec 1 ng E_3	$RC_{1\ ng}$	% traceur lié avec 1 ng E_2	% traceur lié avec 1 ng E_3	$RC_{1\ ng}$
12	71	34,5	44	101,5	31	0	99,5	92,5	6,6
17	65,5	22,5	44	97,5	28	3,5	96,5	69,5	11
22	66,5	24	44	98,5	18,5	1,8	94,5	66	16
26	73	22,5	35	97,5	20,5	2,4	91	46	16,6
32	74	21,5	33	100	21	0	95,5	46	8

entre les degrés de spécificité des trois immunsérums analysés, peut être constatée et dès cette époque, l'immunsérum L 1244 présente un caractère de très haute spécificité, caractère qui se maintiendra par la suite.

Ces résultats ne rejoignent pas les constatations effectuées par THORNEYCROFT et al. (1970) et par HANING et al. (1972) : les premiers auteurs en effet ont suivi l'évolution du taux de réaction de l'estrone avec un anti-estradiol; ce taux a diminué de 40 à 10 % au cours des 8 premiers mois mais est remonté ensuite brusquement après 10 mois, à 90 %. Par ailleurs, HANING et ses collaborateurs ont suivi l'évolution de la spécificité d'un immunsérum anti-aldostérone préparé dans leur laboratoire : les taux de réaction croisée de tous les stéroïdes testés ont diminué rapidement après le premier prélèvement effectué le 28ème jour de l'immunisation et jusqu'à un minimum atteint à 150 jours. Les valeurs des réactions croisées amorçant alors une légère remontée.

CONCLUSION

L'étude immunologique qui a été réalisée sur les immunsérums anti-estrogènes et particulièrement sur les immunsérums anti-estriol permet d'aboutir à plusieurs conclusions :

D'une part, deux procédés d'immunisation légèrement différents ont été comparés. L'efficacité de l'immunisation s'est révélée un peu supérieure lorsqu'une injection unique par voie intradermique est effectuée au lieu d'une injection sous-cutanée hebdomadaire de l'antigène; les caractéristiques immunologiques des immunsérums obtenus par les deux procédés sont identiques.

Il semble par ailleurs qu'il y ait une certaine corrélation entre l'indice d'affinité de liaison, 1/P, et le titre (tableau XX) Cette corrélation n'est cependant parfaite. La corrélation entre la constante d'association K et la sensibilité de chaque immunsérum est plus satisfaisante. Ainsi, la constante d'association du sérum B 2038 est nettement inférieure ($0,9.10^9$) à celle des autres immunsérums (moyenne $2,3.10^9$). Un déplacement significatif du traceur lors de l'établissement de la courbe standard de l'estriol avec ce sérum, n'est obtenu qu'à partir de 200 pg d'estriol alors que 10 à 50 pg sont suffisants avec les autres immunsérums anti-estriol. Aucune caractéristique d'affinité, parmi celles qui ont été mesurées, ne reflète l'aspect de spécificité des immunsérums.

Concernant cette dernière notion de spécificité, la méthode nouvelle qui a été présentée pour quantifier cette qualité immunologique, diffère quelque peu de la méthode classiquement utilisée. Elle semble correspondre plus exactement aux situations rencontrées lors de déterminations spécifiques d'un stéroïde dans un milieu biologique. La garantie apportée par ce critère de réaction croisée à 1 ng a pu être vérifiée par la détermination de l'estriol dans des extraits plasmatiques bruts avec les deux immunsérums L 1244 et L 1258 dont les taux de réaction croisée $RC_{1\ ng}$ étaient notablement différents (tableau XXX).

Parmi les critères généralement utilisés pour la connaissance et le contrôle des fonctions endocriniennes, l'analyse des stéroïdes hormonaux dans les différents milieux biologiques tient une place de choix. En particulier, la détermination des estrogènes et des progestagènes dans les fluides et les tissus biologiques a contribué largement aux connaissances actuellement acquises sur les fonctions ovarienne et placentaire des mammifères.

Depuis les premières preuves apportées par Franck et Goldberger en 1926 en ce qui concerne le sang et par Ascheim et Zondek en 1928 en ce qui concerne l'urine, de la présence de substances estrogènes dans les liquides biologiques humains, de nombreuses études ont été décrites, rapportant l'identification et l'estimation de différents estrogènes dans ces milieux. Les conclusions qui ont pu être tirées de ces déterminations portent aussi bien sur l'origine biologique de ces hormones stéroïdes dans l'organisme, que sur leur métabolisme et leur rôle au cours du cycle ou de la gestation.

De même, les premiers travaux décrivant l'identification et le dosage des progestagènes (MARRIAN en 1929 pour le pregnandiol, REYNOLDS et GINSBURG en 1942 pour la progestérone) dans l'urine et dans le plasma, ont été suivis de beaucoup d'autres aboutissant à une connaissance chaque fois plus approfondie des fonctions du corps jaune ou du placenta chez les mammifères.

La concentration des stéroïdes dans le sang circulant représente un équilibre entre la sécrétion des hormones par les glandes endocrines, leur utilisation par les organes récepteurs et leur élimination par les voies excrétrices. Le dosage de ces hormones dans le sang veineux périphérique permet donc de compléter les indications apportées par la détermination des métabolites urinaires.

TROISIEME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FONCTIONS OVARIENNE ET PLACENTAIRE CHEZ LES MAMMIFERES

Par ailleurs, les stéroïdes se trouvent dans les milieux biologiques sous différentes formes, libres ou conjuguées. La forme libre constitue la partie active de l'hormone alors que la forme conjuguée, physiologiquement peu active, représente essentiellement l'aboutissement du métabolisme de l'hormone. C'est ainsi que des renseignements différents ou complémentaires peuvent être apportés par la détermination de ces différentes fractions.

Parmi les nombreuses données de la littérature, nous avons peu ou pas trouvé d'études concernant les estrogènes libres de l'urine ainsi que la progestérone urinaire chez la femme. De même, si l'estradiol plasmatique est de plus en plus utilisé comme critère biochimique depuis ces dernières années, on n'a que de rares informations sur les fractions libres de l'estrone et de l'estriol du plasma, notamment en tout début de grossesse.

Au cours de notre travail, nous avons analysé plus spécialement l'estrone, l'estradiol, l'estriol et la progestérone dans les fractions libres de l'urine et du plasma, au cours du cycle menstruel, après différentes explorations dynamiques et depuis les premières semaines jusqu'à la fin de la grossesse humaine. Nous discuterons les résultats obtenus dans l'urine et dans le plasma ainsi que les analogies ou les divergences existant entre ces tracés et ceux des métabolites conjugués urinaires.

Par ailleurs, nous avons tenté d'apporter quelques informations nouvelles sur la physiologie de la reproduction chez les petits mammifères tels que le rat ou le cobaye. Nous avons pour cela étudié chez la ratte les estrogènes et la progestérone dans le sang périphérique ainsi que dans celui des veines ovarienne, placentaire et foetale dans différentes circonstances physiologiques : au cours du cycle, de la gestation et après castration. Un travail moins poussé a été réalisé chez le cobaye. Nous discuterons à partir de nos résultats le lieu d'origine des estrogènes et de la progestérone au cours de la gestation chez ces animaux, ainsi que les différentes formes des estrogènes circulants.

CHAPITRE I

STEROIDES HORMONAUX DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES AU COURS DU CYCLE ET DE LA GROSSESSE DE LA FEMME.

A) - CYCLE MENSTRUEL

L'une des difficultés qui a longtemps rendu difficile l'analyse des stéroïdes sanguins au cours du cycle, résidait dans la faiblesse des taux de ces stéroïdes, la sensibilité des techniques étant de loin insuffisante.

Ainsi les premières déterminations d'estrogènes sanguins pendant le cycle de la femme n'ont été effectuées qu'en 1956 par NAKAO et AIZAWA grâce à une technique fluorométrique. Celles-ci furent suivies de nombreuses autres études permettant la détermination fractionnée de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol totaux dans le plasma au cours des deux phases du cycle. Actuellement, les techniques beaucoup plus sensibles de radioimmunocompétition permettent l'analyse de l'estrone et de l'estradiol jusque dans la fraction libre du plasma aussi bien au cours de la phase folliculaire que de la phase lutéale. Le tableau XXXII réunit les taux d'estrogènes libres plasmatiques trouvés par les différents auteurs.

Les premières déterminations de la progestérone plasmatique au cours du cycle menstruel remontent à 1965 où Van der MOLEN utilisa la chromatographie gazeuse pour analyser ce stéroïde. Depuis, de nombreux auteurs, utilisant essentiellement les techniques radiocompétitives, ont étudié le tracé de la progestérone au cours du cycle. Le tableau XXXIII indique les taux donnés dans la littérature pour les deux phases du cycle.

TABLEAU XXXII

TAUX D'ESTRONE ET D'ESTRADIOL PLASMATIQUES (pg/ml) OBTENUS PAR DIFFERENTS AUTEURS

Auteurs	Méthode	ESTRADIOL		ESTRONE	
		Phase folliculaire	Phase lutéale	Phase folliculaire	Phase lutéale
Ichii et al (1963)	F	80-130		190-240	
Svendsen et Sorensen (1964)	DDI	60-750	30-440	50-870	110-210
Baird et Guevara (1969)	DDI	85± 8	191± 20	67± 8	121± 11
Shutt (1969)	CPB	180	470		
Attal (1970)	CPG	60-230	50-1000		
Corker et al (1970)	CPB	63	143		
Van de Wiele et al (1970)2		50-150	200-400		
Korenman et al (1970)	CPB	50-150	150-250	79 ± 4,4	107 ± 8,6
Lehmann et al (1971)		<100	250-400		
Wu et Lundy (1971)	RIA	21± 3		53 ± 4,14	
Thorneycroft (1971)		25-100	50-150		
Mester et al (1971)	CPB	10-70	100-120		
Lloyd et al (1971)	DDI	23-347	81-254	123	87-166
Saez et al (1972)	RIA	77± 12	202 ± 49	71± 11	89± 22
Knox et France (1972)	CPB	55	100		
Edqvist et Johansson (1972)	RIA	25-150	40-90	27(14-38)	40(7-53)

F = Fluorométrie ; DDI = Double Dilution Isotopique ;

CPB = Technique de liaison protéique compétitive

CPG = Chromatographie en phase gazeuse ; RIA = Radioimmunologie.

TABLEAU XXXIII

TAUX DE PROGESTERONE PLASMATIQUE (ng/ml) TROUVES PAR DIFFERENTS AUTEURS

Auteurs	Méthode	Phase folliculaire	Phase lutéale
Van der Molen et Groen (1965)	GLC	0,49 (< 0,15-1,1)	15,2 (7,9-20,6)
Riondel et al. (1967)	DDI	1,13 ± 0,49	10,4 ± 3,2
Yoshimi et Lipsett (1968)	CPB	0,43 (0,05 - 1,50)	
Wyman et Sommerville (1968)	GLC	0,8 (0,3 - 2,9)	11,8 (1,4 - 31)
Johansson (1969)	CPB	0,37 ± 0,08	10 - 20
Van de Wiele et al.(1970)2		< 1	5 - 15
Martin et al. (1970)	CPB	1 ± 0,2	8,2 ± 7,4
Ross et al. (1970)	CPB	< 1	2 - 10
Abraham et al. (1971)2	RIA	0,54 (0,41-0,64)	8,56(1,48-13,5)
Furuyama et Nugent (1971)	RIA	0,26 (0,12-0,79)	8,28 (1,40-17,47)
Lehman et al. (1971)		< 1	10 - 20
Thorneycroft et al. (1971)		< 1	1 - 15
Lloyd et al. (1971)	GLC	1,1 - 2,4	3,5 - 8,7
Youssefnejadian et al. (1972)	RIA	0,42 (0,24-0,79)	7,7 (0,90-9,80)
Holmdahl et Johansson (1972)	CPB	0 - 1,15	14,6
Pichon et Milgrom (1973)	CPB	0,81 ± 0,38	12,5 ± 2,96
Scholler et al. (1973)	RIA	0,27 (0,12-0,67)	12,99 (5,3-22,13)

GLC = chromatographie en phase gazeuse ; DDI = double dilution isotopique

CPB = radiocompétition protéique ; RIA = radioimmunologie.

Résultats personnels

Les estrogènes libres (1) et la progestérone plasmatiques ont été mesurés chez des jeunes femmes normales, à des dates fixes, au milieu de chacune des deux phases de leur cycle. La technique utilisée pour la détermination des estrogènes était celle de radioimmunologie (deuxième partie). La progestérone a été analysée par radiocompétition en utilisant la transcortine du sérum de fin de grossesse comme agent spécifique de liaison, selon la t[illegible] de JOHANSSON (1969). Ces différentes techniques ont été décrite[illegible] dans la deuxième partie de cette thèse.

Le tableau XXXIV présente les valeurs moyennes que nous avons obtenues pour l'estrone et l'estradiol plasmatiques, d'une part, pour la progestérone plasmatique, d'autre part. Les taux des estrogènes plasmatiques ont été comparés aux estrogènes totaux urinaires évalués par la technique classique de fluorométrie (cf. Deuxième partie) et aux estrogènes libres de l'urine évalués par radioimmunocompétition.

D'autre part, les taux de progestérone plasmatique ont été confrontés à ceux obtenus par la même technique pour la progestérone urinaire et à ceux obtenus par la technique de chromatographie gazeuse (deuxième partie) pour le prégnandiol urinaire.

Nous donnons également dans ce tableau les taux de la testostérone plasmatique que nous avons pu mesurer par une technique de radioimmunocompétition utilisant un anticorps spécifique.

La figure 26 résume l'étude complète d'un cycle normal au cours duquel nous avons pu mesurer les modifications de tous les paramètres que nous venons de citer. Le profil bien connu du prégnandiol urinaire avec des valeurs basses dans la première partie du cycle, une courbe en cloche pendant la deuxième partie avec un maximum au milieu de la phase lutéale, se réflète parfaitement dans le tracé de la progestérone plasmatique, l'élévation de [illegible]

(1) Estrogènes directement extractibles par un solvant organique

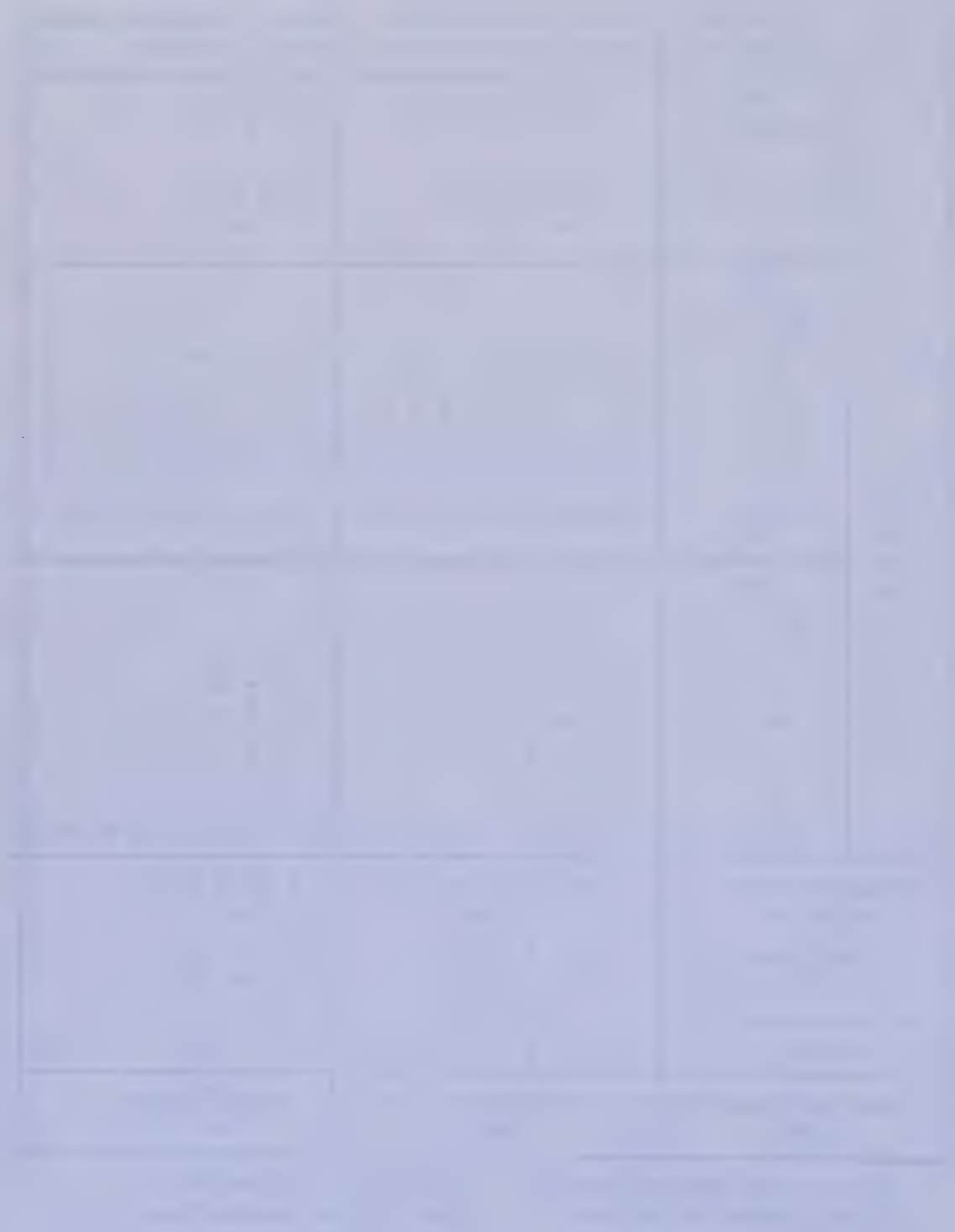
TABLEAU XXXIV

ESTROGENES ET PROGESTAGENES AU COURS DU CYCLE

(Ecarts-types ou extrêmes joints à la moyenne)

	Stéroïde	Phase folliculaire	Phase lutéale
ESTROGENES	TU µg/24 h.	17,2 ± 6,8 n = 5	38,07 ± 11,1 n = 14
	E_3/E_2+E_1	1,11 ± 0,3 n = 5	1,38 ± 0,6 n = 13
	LU ng/24 h.		
	E_1	75,8(57-90) n = 8	160,6(91-242) n = 8
	E_2	21,6 (15-38) n = 8	51,6 (26-107) n = 8
	E_3	93,5(38-143) n = 6	129,8(82-194) n = 5
	E_2/E_1	0,29(0,24-0,42) n=8	0,39(0,23-0,85)n=8
	LP pg/ml		
	E_1	66,5 (58-75) n = 2	158 ± 37 n = 13
	E_2	108 ± 57 n = 5	257 ± 84 n = 18
	E_3	< 50	< 50
	E_2/E_1	0,93 - 1,2, n = 2	1,7(1,2-2,6) n = 13
Pregnandiol U mg/24 h.		0,57 (0,5-0,6) n = 4	3,38 ± 1,56 n = 14
Progestérone U ng/24 h.		500 ± 210 n = 5	1490 ± 520 n = 14
Progestérone P ng/ml		4,6 ± 1,1 n = 5	17,3 ± 5 n = 17
Testostérone P ng/ml		(0,26) n = 1	0,37 ± 0,11 n = 8

n = nombre de cas étudiés
TU = totaux urinaires
U = urine
LU = libres urinaires
LP = libres plasmatiques
P = plasma



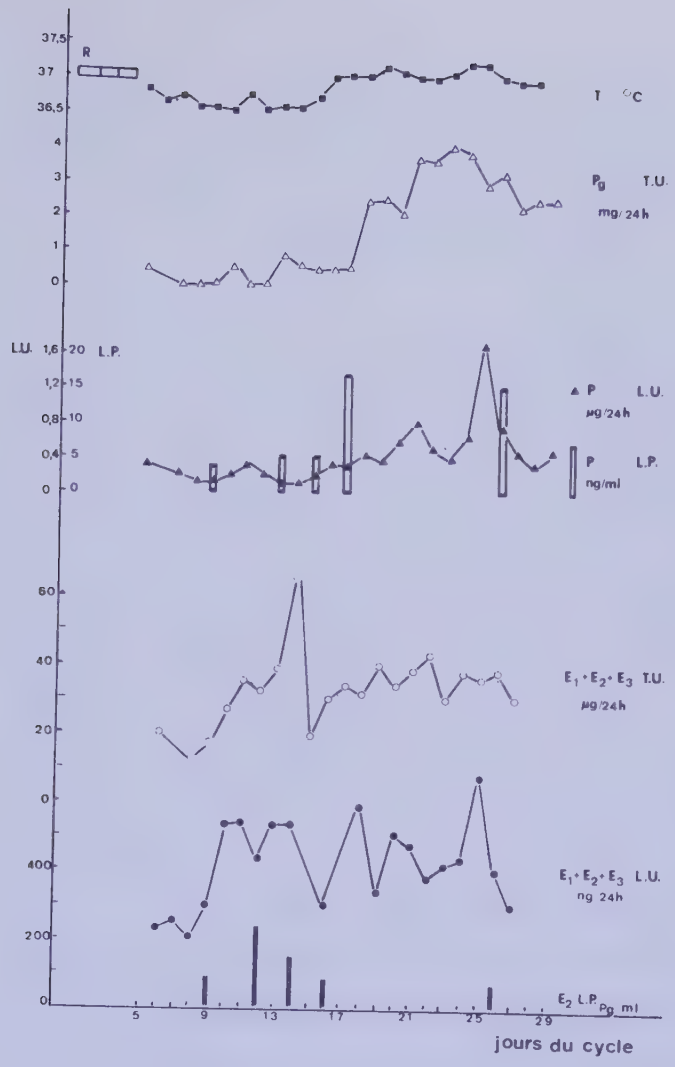


Fig. 26 Stéroïdes plasmatiques et urinaires et courbe de température au cours d'un cycle menstruel normal (T=température basale; R= règles; Pg=prégnandiol; P=progesterone; E_1=estrone; E_2=estradiol; E_3=estriol; L.P=libres plasmatiques; L.U.=libres urinaires; T.U.=totaux urinaires)

progestérone après le décalage thermique est aussi manifeste que pour le prégnandiol mais elle se produit un jour plus tôt. La progestérone urinaire suit exactement le même profil; cependant le décalage entre les deux phases est moins marqué que dans les deux cas précédents.

Nous retrouvons bien pour les estrogènes totaux urinaires, le tracé classique du cycle menstruel : valeurs faibles de la phase folliculaire, élévation dès le 11ème jour du cycle avec pic net le 15ème jour et chute aussi nette le 16ème jour qui est le premier jour du plateau thermique, enfin remontée avec oscillations autour d'une valeur moyenne supérieure à celle de la phase folliculaire. L'estradiol (E_2) plasmatique suit ce même tracé; cependant le pic obtenu au moment de l'ovulation se produit la veille du jour où les estrogènes totaux urinaires atteignent leur maximum. Quant aux estrogènes libres urinaires, leur tracé suit fidèlement celui de l'estradiol plasmatique et celui des estrogènes totaux urinaires.

A partir des taux moyens indiqués dans le tableau XXXIV comme des tracés hormonaux obtenus pour le cycle individuel présenté sur la figure 26, plusieurs faits peuvent être soulignés :

- d'une part une augmentation sensible de tous les paramètres hormonaux pendant la phase lutéale. En particulier, la progestérone urinaire et plasmatique est amplifiée par un facteur 3 ou 4; les estrogènes tant plasmatiques qu'urinaires, l'étant d'un facteur 2 en moyenne.

- d'autre part, alors qu'on n'a pas pu détecter d'estriol libre dans le plasma, des quantités appréciables d'estriol (E_3) libre ont pu être mesurées dans les urines.

- enfin, alors que l'estradiol est l'estrogène prédominant dans la fraction libre du plasma, cette même fraction est, dans l'urine, représentée surtout par l'estrone (DESFOSSES et al. 1973).

Discussion

Les résultats que nous venons de présenter peuvent être comparés à ceux donnés dans la littérature et qui ont été rassemblés dans les tableaux XXXII et XXXIII. Dans cette discussion, nous soulignerons successivement les points importants qui ressortent de cette étude, en nous référant éventuellement aux auteurs cités.

a) Estrone (E_1) et estradiol (E_2) au cours du cycle

Les valeurs de E_1 et de E_2 que nous avons obtenus pour la fraction libre du plasma sont tout à fait comparables à celles qu' nous trouvons dans la littérature. L'élévation bien connue des taux des estrogènes totaux urinaires au cours de la phase lutéal est retrouvée de la même façon pour les estrogènes libres du plas

Dans l'urine, les estrogènes libres n'ont, à notre connaissan pas encore été étudiés au cous du cycle menstruel. Les taux d'estro et d'estradiol sont pourtant, comme nous l'avons vu, loin d'être négligeables, pouvant atteindre pour E_1 notamment 300 ng/24 h. Les deux phases du cycle sont caractérisées par des valeurs très dif pour ces deux estrogènes.

Les estrogènes libres de l'urine et du plasma se différenci essentiellement par les rapports respectifs E_2/E_1. En effet, alo qu'il y a une à deux fois plus d'estradiol que d'estrone libres dans le plasma, ce rapport est inversé dans l'urine; il est de en moyenne (0,08 à 0,31 pour le cycle complet présenté sur figure 26). Par ailleurs, si le rapport E_2/E_1 de l'urine ne se pas évoluer de manière significative au cours du cycle, il n' pas de même pour celui du plasma. Nous avons trouvé une valeur moyenne pour E_2/E_1 plasmatique de 1 en phase folliculaire (0,93-1,2), de 1,7 $\pm$ 0,43 au milieu de la phase lutéale (1,2 - et de 0,9 (0,86 - 0,93) pendant les deux derniers jours du cycle Ces variations du rapport E_2/E_1, reflètent en fait les variati de l'estradiol plasmatique.

Les valeurs respectives d'estradiol et d'estrone libres plasmatiques présentées par SVENDSEN et SORENSEN en 1964 démontraient au contraire des variations tout à fait indépendantes de ces deux estrogènes au cours du cycle. Cependant, BAIRD en 1969 notait une modification significative du rapport E_2/E_1 pendant le cycle : de 0,67 les premiers jours du cycle, ce rapport passait à 1,9 le jour précédent l'ovulation, puis à 1,32 le jour suivant et enfin à une valeur moyenne de 1,63 pendant la phase hyperthermique. Nos résultats concordent donc tout à fait avec ceux de BAIRD et appuient l'hypothèse généralement admise selon laquelle ce serait l'estradiol et non l'estrone qui représenterait l'essentiel de la sécrétion estrogénique de l'ovaire. L'augmentation du rapport E_2/E_1 dans le plasma de la veine ovarienne (7,7) (Lloyd et al. 1971) vient encore appuyer cette hypothèse. Soulignons que les variations de la production des estrogènes ovariens au cours des différentes phases du cycle ne sont pas reflétées dans le rapport E_2/E_1 de la fraction libre urinaire.

b) Estriol (E_3) au cours du cycle

Nous n'avons pas pu détecter d'estriol libre dans le plasma en utilisant notre immunsérum spécifique anti-estriol. A notre connaissance, deux groupes d'auteurs seulement ont indiqué des taux d'estriol libre pour le plasma : WOTIZ et al. (1967) ont trouvé par chromatographie gazeuse chez deux femmes normales des valeurs de 460 et 300 pg/ml. Les taux obtenus par WU et LUNDY (1971) par radioimmunodosage sont sûrement plus proches de la réalité : 29,1 $\pm$ 2,72 pg/ml au 3ème jour du cycle et 9,2 $\pm$ 3,83 pg/ml au 27ème jour.

Dans l'urine, en revanche, nous trouvons des quantités mesurables d'estriol libre, plus importantes en phase lutéale qu'en phase folliculaire. La majeure partie de l'estriol urinaire cependant est conjuguée puisqu'après hydrolyse enzymatique, nous en retrouvons 11,5 µg/24 h. en phase folliculaire (7 à 16) et 21,7 µg/24 h. en phase lutéale (12 à 42). Il semble néanmoins,

et nous le confirmerons pas la suite, que la détermination de l'estriol libre de l'urine soit un indice important dans l'évaluation des fonctions ovarienne ou placentaire humaines.

c) Comparaison des estrogènes libres et conjugués urinaires

Au cours du cycle menstruel, les trois estrogènes libres urinaires représentent 1 à 2 % des estrogènes totaux excrétés. Nous savons par ailleurs que la fraction glycuronide a une part prépondérante.

La répartition des trois estrogènes de la fraction libre urinaire est très différente de celle des estrogènes totaux. Ce fait est très bien mis en évidence lorsque l'on compare les rapports $E_3/(E_2 + E_1)$ dans la fraction libre de l'urine d'une part et après hydrolyse d'autre part. Nous avons indiqué dans le tableau XXXIV que ce rapport est en moyenne de 1,11 et de 1,38 respectivement pour les estrogènes totaux au cours des deux phases du cycle. Pour la fraction libre, ce rapport est toujours inférieur à l'unité (0,51 en moyenne pour le cycle complet présenté avec des variations de 0,20 à 0,94) et ce n'est qu'au cours de la grossesse que nous verrons ce rapport s'inverser.

d) La progestérone au cours du cycle

Les valeurs moyennes que nous avons obtenues pour la progestérone plasmatique (tableau XXXIV) sont un peu supérieures à celles trouvées dans la littérature (tableau XXXIII). Nous avons déjà signalé que la technique de radiocompétition utilisant la protéine de liaison présente dans le sérum humain en fin de grossesse était moins spécifique que le radioimmunodosage. Nous avons pu vérifier en déterminant la progestérone dans des échantillons plasmatiques par les deux méthodes que ceci expliquait les valeurs un peu excessives de nos moyennes. Néanmoins, ayant commencé à doser la progestérone par la technique de radiocompétition protéique, nous avons préféré continuer avec cette méthode pour des raisons

d'homogénéité de résultats.

La différence très significative entre les taux de la phase folliculaire et ceux de la phase lutéale permet d'affirmer l'absence ou la présence d'un corps jaune avec la même certitude que celle donnée par les taux du prégnandiol urinaire.

La progestérone urinaire a été déterminée par la même technique de radiocompétition. Les taux de 500 ng/24 h. en phase folliculaire et de 1490 ng/24 h. en phase lutéale sont relativement importants. Nous avons pu constater que le tracé de ce stéroïde au cours du cycle avait la même allure que celui du prégnandiol (fig.26). Le dosage de la progestérone urinaire n'a été effectué que très rarement : Van der MOLEN et CORPECHOT (1968) l'ont mentionné dans une de leurs études, lui attribuant des taux de 50 à 500 ng/24 h. au cours du cycle.

Par rapport à celle du prégnandiol, la concentration de la progestérone urinaire est au moins 1000 fois plus faible. Néanmoins, les techniques d'analyse actuelles permettent de doser facilement ce stéroïde et les renseignements apportés par sa détermination ne sont peut-être pas, comme nous le verrons, à négliger.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les relations entre les estrogènes libres du plasma et les estrogènes libres et conjugués de l'urine au cours du cycle menstruel.

Il apparait que le rapport E_2/E_1 est inversé dans l'urine par rapport à ce qu'il est dans le plasma et qu'il n'y a que des traces d'estriol plasmatique contre des quantités mesurables d'estriol libre urinaire. Dans le plasma, c'est l'estradiol qui subit les variations les plus importantes et qui peut être considéré comme le reflet de la production des estrogènes par l'ovaire; l'estrone plasmatique est un sous-produit d'intérêt secondaire. Cela est bien différent dans les urines où l'estrone est le représentant

dominant des estrogènes.

Le tracé de l'estrone, ou mieux de la somme E_1+E_2 urinaires est comparable au tracé de la somme E_1+E_2 plasmatiques au cours du cycle menstruel, ainsi qu'au tracé des estrogènes totaux urinaires. On peut donc apprécier l'activité estrogène sur un prélèvement d'urine fraîche et en retirer des données qui sont aussi valables que celles que l'on retire de l'estradiol plasmatique. L'estimation de l'estriol libre urinaire semble être un bon indice également de l'activité ovarienne au cours du cycle.

Si nous estimons la clearance rénale moyenne de l'estrone et de l'estradiol en ml/min., nous constatons qu'elle est voisine de l'unité pour l'estrone (1,14 ml/min. en moyenne avec des variations de 0,60 à 1,7) et qu'elle est beaucoup plus faible pour l'estradiol (0,22 ml/min. en moyenne avec des variations de 0,15 à 0,34).

Les données que nous avons trouvées pour les estrogènes ne sont pas comparables à celles que nous constatons pour la progestérone plasmatique ou urinaire. Cette dernière passe bien dans ces deux liquides biologiques de 1 en phase folliculaire à 3 ou 4 en phase lutéale, ce qui laisse espérer à priori que cette variation pourrait être exploitée comme dans le cas précédent; nous y reviendrons dans le chapitre suivant. La clearance moyenne n'est cette fois que de 0,038 ml de plasma par minute (de 0,016 à 0,045). D'après cette dernière valeur ainsi que celles obtenues pour l'estrone et pour l'estradiol, il apparait que la clearance d'un stéroïde est d'autant plus élevée que la polarité du stéroïde est grande, le deuxième paramètre étant de toute évidence une éventuelle liaison avec une protéine de transport. Ainsi la progestérone a une très faible polarité; par ailleurs elle est liée à la transcortine, d'où sa faible clearance. L'estradiol, bien que plus polaire que l'estrone, est fortement lié à la sex binding globulin (SBG) et possède donc une clearance inférieure à celle de l'estrone. Nous verrons, au cours de la grossesse, que l'estriol a une clearance rénale beaucoup plus élevée que celle des deux autres estrogènes.

B) - STIMULATION FOLLICULAIRE PAR HMG

Les facteurs de stimulation des follicules ovariens sont :

- la gonadotrophine d'origine ménopausale, HMG
- la gonadotrophine de sérum de jument gravide, PMSG
- la gonadotrophine hypophysaire humaine, HPG
- des substances chimiques ayant la propriété de stimuler la production de HMG par le système hypothalamo-hypophysaire et dont la plus utilisée est le citrate de clomifène (ou clomid); ces dernières substances peuvent être utilisées seules ou en association avec les gonadotrophines à activité FSH prédominante.

Le traitement des femmes aménorrhéiques par ces facteurs de stimulation folliculaire, permet une induction de l'ovulation qui peut être suivie de grossesse. Longtemps, l'induction de l'ovulation s'est faite sans contrôle et, comme la sensibilité aux agents stimulants varie d'une malade à l'autre, les mêmes doses ne produisent pas les mêmes effets. Parfois, le dosage de la gonadotrophine est trop faible pour déterminer la maturité folliculaire; dans d'autres cas, les mêmes doses provoquent la formation de plusieurs follicules de de Graaf, ce qui conduit à des multiovulations redoutables (PALMER et KLEIN, 1970). Des accidents péritonéaux plus graves, voire mortels, ont été décrits dans la littérature (MULLER, 1962).

D'après la longue expérience acquise par M.F. JAYLE dans le domaine de l'utilisation des gonadotrophines en gynécologie, la stimulation folliculaire doit être réalisée pendant 10 jours consécutifs en administrant une quantité de HMG variable d'un sujet à l'autre (JAYLE, 1968). On peut également réaliser une stimulation mixte en administrant pendant 5 jours 100 mg de clomifène par voie orale et les 5 jours suivants, une ou deux ampoules de 75 à 150 U.I. RP_2 de HMG. Ce mode de stimulation est plus conforme à la durée physiologique de la stimulation hypo-

physaire que des traitements de plus courte durée.

Les urines sont prélevées pendant la nuit suivant la dernière injection. Sur ce prélèvement de 12 heures, on pratique le dosage des estrogènes par une méthode fluorométrique rapide (ADESSI et JAYLE, 1972) qui permet d'avoir les résultats en 4 heures environ. On considère que le follicule est mature lorsque le taux des estrogènes totaux, exprimé en équivalents d'estrone par 24 h., est compris entre 70 et 120 µg, la dose optimale étant comprise entre 70 et 90 µg. Au-dessous de 70 µg, la stimulation est insuffisante et la dose de HMG doit être doublée dans le prochain essai thérapeutique.

Il était intéressant de comparer le dosage des estrogènes totaux urinaires réalisé après stimulation par HMG, à celui des différentes fractions libres des trois estrogènes, réalisé simultanément dans le plasma et dans les urines.

Résultats et discussion

Le tableau XXXV résume les résultats des analyses hormonales que nous avons réalisées dans le plasma et dans les urines de plus de 20 patientes qui avaient été stimulées par HMG selon le protocole décrit ci-dessus.

a) Estrogènes libres plasmatiques

La comparaison des taux obtenus pour les estrogènes libres plasmatiques au cours d'une phase folliculaire normale ou après stimulation par HMG, montre une augmentation considérable des concentrations sanguines (de 7 à 8 fois) dans ce dernier cas. Cette stimulation est relativement plus importante que celle constatée pour les estrogènes totaux urinaires (le facteur d'augmentation est de 4 à 5 pour ces derniers). Il y a cependant une corrélation satisfaisante entre les deux catégories de valeurs puisque nous avons pu trouver un coefficient de corrélation r de 0,85.
Sur la figure 27, nous avons déssiné la droite de régression des estrogènes totaux urinaires en fonction de l'estradiol plasmatique;

TABLEAU XXXV

TAUX DES STEROIDES APRES HMG

(Moyenne, ± SD ou extrêmes)

	Stéroïde	Réponse insuffisante	Réponse normale
ESTROGENES	TU µg/24 h.	24,6 ± 7,7 (n = 10)	80,6 ± 23 (n = 13)
	E_3/E_2+E_1	0,92 ± 0,24(n = 7)	0,79 ± 0,17(n = 12)
	LU ng/24 h.		
	E_1	381 ± 185 (n = 8)	667 ± 286 (n = 9)
	E_2	119 ± 95 (n = 8)	201 ± 79 (n = 9)
	E_3	169 ± 80 (n = 8)	279 ± 86 (n = 7)
	E_2/E_1	0,1 - 0,4	0,1 - 0,4
	LP pg/ml		
	E_1	188 ± 65 (n = 9)	446 ± 249 (n = 9)
	E_2	348 ± 214 (n = 10)	888 ± 455 (n = 13)
	E_2/E_1	1,98 ± 1,18 (n = 9)	2,05 ± 0,95(n=9)
Pregnandiol U mg/24 h.		1,5 ± 1,2 (n = 6)	1,9 ± 2,0 (n = 9)
Progestérone U ng/24 h.		500 ± 200 (n = 8)	690 ± 400 (n =10)
Progestérone P ng/ml		6,3 ± 3,8 (n = 8)	7,3 ± 4,6 (n =11)
Testostérone P ng/ml		0,38(0,22-0,55) (n= 3)	0,32 - 0,47 (n=2)

TU = totaux urinaires LP = libres plasmatiques

LU = libres urinaires U = urine

P = plasma (n) = nombre de cas étudiés

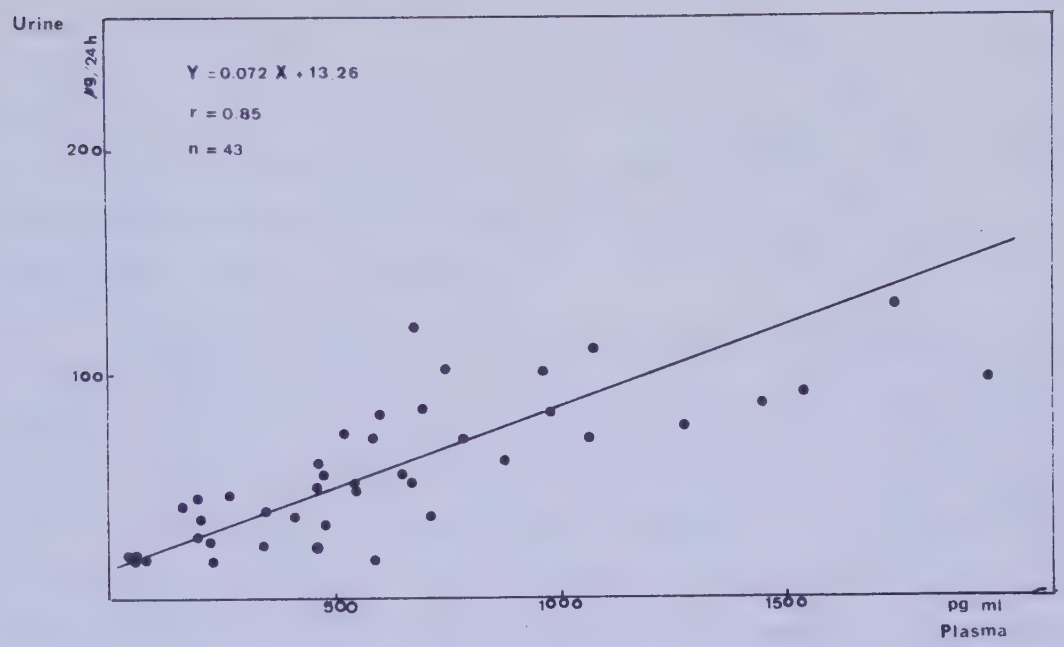


Fig. 2. Corrélation entre les estrogènes totaux urinaires et l'estradiol libre plasmatique après stimulation par HMG

on peut constater que la majorité des points sont très proches de cette droite.

Le rapport de l'estradiol sur l'estrone dans le plasma est de l'ordre de 1,9 donné par BAIRD pour la période de l'ovulation (BAIRD et GUEVARA, 1969). Il est nettement supérieur à ceux que nous avons obtenus en phase folliculaire et en phase lutéale (respectivement 1,07 et 1,70). Il n'y a cependant pas de différence de ce rapport entre les réponses insuffisantes (E_2/E_1 = 1,98 et les réponses considérées comme normales à l'épreuve de stimulation (E_2/E_1 = 2,05).

D'après les expériences décrites dans la littérature, le contrôle hormonal effectué après stimulation folliculaire par HMG concerne le plus souvent les estrogènes totaux urinaires seulement. Très rares sont les données concernant les estrogènes libres plasmatiques. Cependant Van de WIELE et ses collaborateurs (1970) ont rapporté le cas d'une femme hypophysectomisée, traitée par 6 ampoules de HMG. A la suite de ce traitement, les estrogènes libres plasmatiques exprimés en équivalents d'estradiol étaient augmentés jusqu'à 1300 pg/ml. Récemment, ce même auteur rapportait un cas identique (JEWELEWICZ et al. 1973) pour lequel les estrogènes libres plasmatiques s'élevaient après traitement à 4000 pg/ml. Les résultats très faibles trouvés par WU et al. pour deux patientes, respectivement 47 et 380 pg/ml de plasma (1973) sont dûs probablement aux quantités insuffisantes de gonadotrophines administrées.

b) Estrogènes libres urinaires

Si la réponse à la stimulation folliculaire est généralement jugée d'après les valeurs des estrogènes totaux urinaires, nous pouvons constater ici que la surproduction d'estrogènes par le follicule ovarien après stimulation par HMG est reflétée aussi bien par les taux des estrogènes libres urinaires que par ceux du plasma. L'estrone, l'estradiol et l'estriol libres de l'urine sont en effet

très augmentés par rapport à ceux d'une phase folliculaire normale. Il y a une bonne corrélation entre les valeurs des estrogènes libres dans l'urine et dans le plasma (r = 0,84). Mais contrairement à ce qui se passe dans le plasma, le rapport E_2/E_1 dans la fraction libre urinaire n'est pas influencé par l'activité ovarienne et il est identique en phase folliculaire, en phase lutéale et après stimulation par HMG. On aurait pu s'attendre à un résultat contraire en raisonnant par analogie à partir des données de la stimulation corticosurranélienne par l'ACTH (COST, 1963) : avant stimulation, le rapport cortisol/cortisone est inférieur à l'unité; après stimulation, il s'élève d'autant plus que la stimulation est plus élevée, pouvant dépasser 50. Ceci laisse supposer qu'il existe dans le rein une 17-hydroxy-déshydrogénase spécifique qui convertit l'estradiol libre en estrone.

Les clearances rénales de l'estrone et de l'estradiol libres après HMG sont respectivement de 1,49 ml/min.(1,19 - 1,94) et de 0,19 ml/min. (0,12 - 0,27).

c) La progestérone

Comme on pouvait s'y attendre, la stimulation par HMG n'influence pas la production de progestérone. Les taux moyens dans l'urine et dans le plasma ne sont en effet pas modifiés.

Nous avons cependant pu constater, au cours de ces épreuves dynamiques par HMG, qu'il existait assez souvent des discordances entre des taux faibles de prégnandiol urinaire attestant l'absence de corps jaune et des taux relativement élevés de progestérone plasmatique, comparables à ceux trouvés en phase lutéale. SCHOLLER et al. (1973) ont tout récemment rapporté des observations analogues faites lors de l'étude des cycles normaux: alors qu'aucun taux de prégnandiol supérieur à 2 mg/24 h. n'est accompagné de taux de progestérone plasmatique inférieur à 5 ng/ml, il est arrivé relativement souvent à ces auteurs de rencontrer des taux de progestérone élevés, accompagnant des valeurs de prégnandiol inférieures à 2 mg/24 h. Certes, il est connu que de faibles quantités de progestérone existent dans le plasma pendant la première moitié du cycle. FEDER et ses collaborateurs (1968) ont même noté chez le

cobaye un pic pré-ovulatoire de progestérone. De même, ETO et al. (1962), HASHIMOTO et al. (1968) ont trouvé un pic analogue chez le rat. De son côté, GREEN en 1955 avait démontré une sécrétion de progestérone chez les souris impubères après administration de doses très faibles de sérum de jument gravide alors que l'ovaire de ces animaux restait inchangé.

Il semble peu probable que ces différentes constatations puissent expliquer les divergences que nous avons observées entre le pregnandiol urinaire et la progestérone plasmatique. La technique utilisée pour doser la progestérone n'étant pas, comme nous l'avons vu, d'une spécificité absolue, il est possible que la présence de quantités peut-être plus importantes après HMG, de stéroïdes présentant une affinité plus ou moins grande pour la transcortine (17α- ou 20α-hydroxy-progestérone, par exemple) soit un des éléments de ce problème.

Quoiqu'il en soit, la stimulation folliculaire par HMG ne peut pas conduire à la formation d'un corps jaune dans un cycle anovulatoire lorsqu'elle est administrée seule. Il est en effet bien connu que cette gonadotrophine d'origine ménopausale peut seulement produire un accroissement folliculaire (LUNENFELD et DONINI, 1963 - DICZFALUSY et PALMER, 1967). Elle ne peut conduire à une ovulation que lorsqu'elle est suivie d'une administration de gonadotrophine chorionique.

C) - STIMULATION DU CORPS JAUNE OVARIEN

On dispose de deux méthodes pour stimuler les fonctions endocriniennes du corps jaune ovarien : la première consiste à stimuler l'activité des follicules ovariens avant l'ovulation en utilisant soit HMG à des doses suffisantes pendant 5 à 10 jours, soit 100 mg de clomifène par jour pendant 5 jours. L'activité endocrinienne du corps jaune est potentiellement contenue dans les assises de la granulosa et de la thèque interne du follicule mature. Aussi le corps jaune sera-t-il d'autant plus actif que l'hyperplasie des cellules folliculaires sera plus marquée. Nous verrons que les résultats obtenus sont en plein accord avec ce postulat.

Les gonadotrophines chorioniques sécrétées par le trophoblaste, après la nidation de l'oeuf, convertissent le corps jaune cyclique en un corps jaune pseudo-gestatif. Cette épreuve de stimulation a été standardisée par JAYLE (1962) conformément au schéma de la figure 28 :

Figure 28 - Epreuve par gonadotrophine chorionique humaine (HCG) associée à la dexaméthasone (DXM).

Il a été établi sur un très grand nombre de résultats que le corps jaune pseudogestatif, obtenu après administration de 15.000 U.I. de HCG, avait, du point de vue de l'excrétion du prégnandiol et des estrogènes totaux urinaires, une activité deux fois plus importante que celle du corps jaune cyclique chez la même personne. Ce corps jaune pseudogestatif a une activité comparable à celle que l'on trouve chez une femme enceinte, deux semaines après la fécondation.

Dans l'épreuve dite de stimulation-freinage, on fait ingérer à la patiente 3 mg de dexaméthasone pendant 6 jours consécutifs après la première injection de HCG.

La stimulation mixte, enfin, qui est celle de l'induction de l'ovulation, qu'elle se fasse chez une femme réglée ou aménorrhéique, associe une stimulation pré-ovulatoire à l'administration de HCG qui déclenche l'ovulation.

I) STIMULATION PAR LE CLOMIFENE

Neuf patientes ont reçu 500 mg de clomifène du 5ème au 9ème jour après le premier jour des règles et les urines ainsi que le sang ont été prélevés le 5ème jour après le décalage de la température, soit au milieu de la phase lutéale. Dans deux cas (tableau XXXVI), on a prélevé également le sang et les urines le 5ème jour d'une phase lutéale contrôle. Les 9 patientes ont été séparées en deux catégories selon que la réponse est indiscutable ou selon que les taux de progestérone et d'estradiol, ou de leurs métabolites correspondent à ceux d'une phase lutéale habituelle (tableau XXXVII).

a) lorsque l'on compare les taux des stéroïdes avant et après test chez les deux patientes pour lesquelles on a pu étudier un cycle contrôle, la réponse du corps jaune est, dans un cas, très nette pour tous les paramètres hormonaux. Dans l'autre cas, seules les valeurs de l'estradiol et de la progestérone plasmatiques s'élèvent significativement contrairement au pregnandiol et aux estrogènes totaux urinaires qui ne sont pas modifiés.

b) On peut noter une bonne corrélation entre les valeurs des estrogènes libres urinaires et plasmatiques. Dans les cas où la réponse à la stimulation est positive, on peut noter en effet une forte augmentation de chaque estrogène. Les clearances rénales moyennes des deux estrogènes libres sont analogues à celles obtenues après HMG.

Alors que les conclusions de LEHMANN et al. (1973) laissent entendre que le clomifène, administré seul, ne provoque pas d'augmentation de l'estradiol plasmatique, nos résultats montrent au contraire une bonne stimulation de la production estrogénique dans la plupart des cas.

c) La progestérone se trouve, tant dans l'urine que dans le plasma, à des concentrations nettement plus élevées que celles

TABLEAU XXXVI

TAUX DES ESTROGENES ET DES PROGESTAGENES PENDANT UN CYCLE NORMAL ET APRES CLOMIFENE CHEZ DEUX PATIENTES STERILES.

	Stéroïde	Mme W Avant	Mme W Après	Mme S Avant	Mme S Après
ESTROGENES	TU µg/24 h.	50	49	25	55
	E_3/E_2+E_1	2,3	2,06	0,92	0,81
	LP pg/ml				
	E_1	110	165	158	230
	E_2	280	550	290	475
	E_2/E_1	2,54	3,33	1,77	2,06
	Pregnandiol U mg/24 h.	6	7,5	1,3	5,4
	Progestérone P ng/ml	15,5	25,1	20	44,2

TU = totaux urinaires ; LP = libres plasmatiques

U = urine; P = plasma

TABLEAU XXXVII

TAUX DES STEROIDES APRES CLOMIFENE
(moyenne et extrêmes)

	Stéroïde	Absence de réponse	Réponse positive
ESTROGENES	TU µg/24 h.	22(15-34) (n = 3)	67,9(49-100) (n = 6)
	E_3/E_2+E_1	0,87(0,37-1,12)(n=3)	1,1(0,63-2,06)(n=3)
	LU ng/24 h.		
	E_1	(55) n = 1	545(330-850) (n = 3)
	E_2	(25) n = 1	228(110-345) (n = 3)
	E_3	(< 25) n = 1	837(580-1095)(n = 2)
	E_2/E_1	(0,45) n = 1	0,41(0,33-0,52)(n=3)
	LP pg/ml		
	E_1	156(120-175)(n=3)	317(165-430) (n = 6)
	E_2	163(55-230) (n=3)	667(460-980) (n=6)
	E_2/E_1	0,97(0,46-1,31)(n=3)	2,24(1,16-3,33)(n=6)
Pregnandiol U mg/24 h.		2,28(0,8-5) (n = 3)	7,3(5,4-9,7) (n=5)
Progestérone U ng/24 h.		410(350-480)(n = 2)	2430(1450-3150)(n=3)
Progestérone P ng/ml		12,2 (10,2-15)(n=3)	37,1(20,3-53,6)(n=5)

TU = totaux urinaires LP = libres plasmatiques

LU = libres urinaires U = urine

P = plasma

d'une phase lutéale normale, lorsque la réponse à la stimulation par clomifène est positive. L'augmentation des taux de la progestérone est donc un bon reflet de la stimulation du corps jaune par ce traitement pré-ovulatoire.

En conclusion, il apparait nettement à partir de l'ensemble de ces résultats que l'administration de clomifène dans les 10 premiers jours du cycle menstruel a pour conséquence, dans les 2/3 des cas, une forte augmentation de l'activité progestagène et estrogène du corps jaune au milieu de la phase lutéale. Cela confirme l'hypothèse que l'activité endocrinienne du corps jaune est un reflet du développement des assises cellulaires du follicule de de Graaf mature. Il s'ensuit que la stimulation du corps jaune doit se faire de préférence en administrant du clomifène ou une gonadotrophine à activité FSH pendant la phase pre-ovulatoire du cycle menstruel.

II) TRANSFORMATION PSEUDO-GESTATIVE DU CORPS JAUNE PAR HCG

1) Traitement par HCG seul

Le groupe des patientes stimulées par l'administration de 15.000 U.I. de gonadotrophines chorioniques (HCG) est subdivisé en deux catégories selon que l'excrétion des estrogènes totaux urinaires est normale (60 à 90 µg/24 h.) ou insuffisante (< 60 µg/24 h.)

Si nous avons pris le taux des estrogènes totaux urinaires comme facteur de discrimination, c'est qu'il est bien établi en clinique humaine que l'insuffisance estrogène, dénommée encore insuffisance thécale, est le facteur déterminant des stérilités et des avortements (JAYLE 1965 - JAYLE et PALMER, 1973 - COHEN et AUDEBERT, 1973).

Nous analyserons séparément les résultats des estrogènes plasmatiques et urinaires et ceux de la progestérone pour les deux sous-groupes qui ont reçu HCG avec ou sans dexaméthasone (DXM). En effet, en raison de l'homogénéité de la réponse lutéale, nous discuterons dans le même paragraphe les valeurs de la progestérone et du prégnandiol après stimulation par HCG en présence ou non de DXM.

Résultats

Les valeurs des stéroïdes hormonaux étudiés après transformation pseudo-gestative du corps jaune par HCG sont indiqués dans le tableau XXXVIII.

Si l'estrone plasmatique est un peu plus élevée que dans une phase lutéale normale, on peut constater que les taux d'estradiol ne sont pas modifiés.

De même, les estrogènes libres urinaires sont plus forts que ceux d'un cycle non stimulé mais leurs valeurs sont identiques, que l'augmentation des estrogènes totaux urinaires soit normale ou insuffisante.

Le rapport E_2/E_1 du plasma est respectivement de 1,12 et de 1,23 dans les deux catégories de réponses, donc beaucoup plus faible que celui trouvé au moment de l'ovulation ou après administration de HMG ($E_2/E_1 = 2$).

Dans les urines, le rapport E_2/E_1 est de 0,30 environ, donc comparable à celui d'un corps jaune normal.

La clearance rénale de l'estrone est analogue à celle obtenue après stimulation pré-ovulatoire. Celle de l'estradiol est augmentée, étant en moyenne de 0,55 ml/min.

Discussion

Les estrogènes libres du plasma et des urines demeurent donc, après HCG, dans les limites de ceux des phases lutéales contrôle. Si l'on analyse de plus près les résultats, on trouve que pour des taux d'estrogènes totaux urinaires identiques, d'une part l'estrone et l'estradiol plasmatiques après HCG ne sont que 50 et 30 % respectivement des taux obtenus après stimulation par HMG; d'autre par le rapport E_2/E_1 est voisin de 2 après HMG et seulement de 1,2 après HCG. On est donc amené à supposer que les cellules thécales lutéinisées du corps jaune sécrètent des quantités relativement plus importantes d'estrone que d'estradiol. Comme l'estrone n'est

TABLEAU XXXVIII

TAUX DES STEROIDES APRES HCG
(moyennes ± SD ou extrêmes)

	Stéroïde	Réponse insuffisante	Réponse normale
ESTROGENES	TU µg/24 h.	40,9 ± 9 (n = 8)	82 ± 27 (n = 10)
	E_3/E_2+E_1	1,13 ± 0,53(n = 7)	0,96 ± 0,36 (n = 9)
	LU ng/24 h.		
	E_1	364(210-600) (n = 4)	380 ± 224 (n = 8)
	E_2	106(70-175 (n = 4)	138 ± 84 (n = 8)
	E_3	322(92-510)(n = 3)	319 ±171 (n = 5)
	E_2/E_1	0,30(0,26-0,33)(n=4)	0,33 ±0,15 (n = 7)
	LP pg/ml		
	E_1	188(170-220) (n=3)	226 ± 95 (n = 5)
	E_2	263 ± 119 (n = 8)	258 ± 57 (n = 9)
	E_2/E_1	1,12(0,86-1,29)(n=3)	1,23 ± 0,29 (n=5)
Pregnandiol U mg/24 h.		6,6 ± 4,6 (n = 8)	6,7 ± 3,2 (n = 10)
Progestérone U ng/24 h.		2517 ± 1210 (n = 6)	2610 ± 1140 (n = 9)
Progestérone P ng/ml		35,6 ± 13 (n = 8)	29 ± 13 (n = 9)
Testostérone P ng/ml		0,54 (0,22-0,87)n=3	0,54(0,37-0,71) n = 2

TU = totaux urinaires
LU = libres urinaires
P = plasma
LP = libres plasmatiques
U = urine
(n) = nombre de cas étudiés

que faiblement liée aux protéines de transport, elle est de ce fait plus rapidement métabolisée au niveau du foie ou franchit plus rapidement le filtre rénal.

Cette sécrétion plus importante d'estrone sous l'effet de HCG peut donc expliquer les résultats apparemment contradictoires présentés plus haut. Les cellules thécales lutéinisées du corps jaune, lorsqu'elles sont stimulées par HCG produisent les estrogènes dans un rapport E_2/E_1 qui parait donc différent de celui qu'on trouve au niveau de la thèque interne folliculaire.

2) Stimulation par HCG sous freinage des surrénales par dexaméthasone

Nous avons utilisé les mêmes critères pour classer en deux sous-groupes les résultats obtenus chez des patientes soumises à l'épreuve de stimulation-freinage. Les résultats sont indiqués dans le tableau XXXIX.

Nous constatons pour l'estradiol plasmatique une différence importante entre les réponses insuffisantes en termes d'estrogènes urinaires et les réponses normales. Néanmoins, pour un taux comparable d'estrogènes totaux urinaires, le taux d'estradiol plasmatique est presque deux fois plus faible qu'après HMG.

Le rapport E_2/E_1 du plasma est de 1,46 pour les réponses normales, c'est-à-dire intermédiaire entre celui obtenu après HCG seul et celui obtenu après HMG. Les clearances rénales de l'estrone et de l'estradiol sont les mêmes que celles mesurées pendant le cycle.

Quelles sont les raisons que l'on peut évoquer pour expliquer que les estrogènes libres plasmatiques et urinaires occupent ici une position intermédiaire entre celles que l'on constate après HMG et après HCG sans DXM ? Le seul facteur variable entre les deux stimulations du corps jaune est l'addition de dexaméthasone au traitement. On peut donc supposer que ce corticoïde modifie le métabolisme de l'estradiol-17β au niveau du corps jaune et diminue sa conversion en estrone. En précisant cette hypothèse, on peut suggérer que la 17β-hydroxy-déshydrogénase présente dans les cellules

TABLEAU XXXIX

TAUX DES STEROIDES APRES HCG + DXM
(moyenne ± SD ou extrêmes)

	Stéroïde	Réponse insuffisante	Réponse normale
ESTROGENES	TU µg/24 h.	32,6 ± 5,3 (n = 5)	85,9 ± 22,1 (n = 10)
	E_3/E_2+E_1	1,25 ± 0,55 (n= 5)	1,3 ± 0,3 (n = 10)
	LU ng/24 h.		
	E_1	182 (77-390) (n = 3)	398 ± 340 (n = 5)
	E_2	35 ± 28,3 (n = 5)	150 ± 79 (n = 6)
	E_3	(285) (n = 1)	562(330-795) (n = 2)
	E_2/E_1	(0,75-0,18)(n = 2)	0,41(0,17-0,71)(n=4)
	LP pg/ml		
	E_1	(90-150) (n = 2)	310 ± 114 (n = 10)
	E_2	(170 ± 47) (n = 5)	470 ± 294 (n = 10)
	E_2/E_1	(1,11-1,23) (n = 2)	1,46 ± 0,55 (n=10)
Pregnandiol U mg/24 h.		5,4 ± 2,3 (n = 5)	7,8 ± 3,2 (n = 9)
Progestérone U ng/24 h.		2300 ± 800 (n = 5)	3580 ± 2420 (n = 8)
Progestérone P ng/ml		26,4 ± 21,7 (n = 5)	48,6 ± 21,5 (n = 9)
Testostérone P ng/ml		(0,29) (n = 1)	0,4 (0,26-0,55)(n=3)

TU = totaux urinaires
LU = libres urinaires
P = plasma
LP = libres plasmatiques
U = urine
(n) = nombre de cas étudiés

lutéales est partiellement inhibée par la dexaméthasone.

3) La progestérone après stimulation lutéale

Dans les tableaux XXXVIII et XXXIX, nous avons pu constater l'élévation des taux de la progestérone plasmatique après traitement par HCG seul ou associée à DXM. Ce progestagène est en effet deux fois plus élevé qu'au cours de la phase lutéale normale, que les taux d'estrogènes excrétés soient normaux ou insuffisants.

La stimulation lutéale provoquée par les gonadotrophines chorioniques est analogue à celle causée par le clomifène. La progestérone urinaire après stimulation par HCG est augmentée régulièrement par un facteur 1,5 à 2,5. La corrélation entre la progestérone urinaire et la progestérone circulante est : r = 0,79. La figure 28 présente la droite de régression entre ces deux paramètres ainsi que la répartition de tous les points autour de cette droite. La clearance moyenne de la progestérone est, pour le corps jaune pseudo-gestatif, analogue à celle du corps jaune cyclique puisque nous obtenons ici un chiffre moyen de 0,049 ml/min.

A propos des relations existant entre la progestérone urinaire et celle du plasma, nous nous permettrons une courte digression. Le tableau XL indique les différents coefficients de corrélation que nous avons trouvés entre ces deux composantes dans les conditions physiologiques variées que nous avons étudiées.

TABLEAU XL

Conditions physiologiques	Coefficient de corrélation r
Cycles normaux et stimulation pré-ovulatoire	0,78
Stimulation par HCG (avec ou sans DXM)	0,79
Corps jaune gestatif (5 à 12 semaines)	0,41
2ème et 3ème trimestre de grossesse	0,43

COEFFICIENT DE CORRELATION ENTRE LA PROGESTERONE DE L'URINE ET CELLE DU PLASMA.

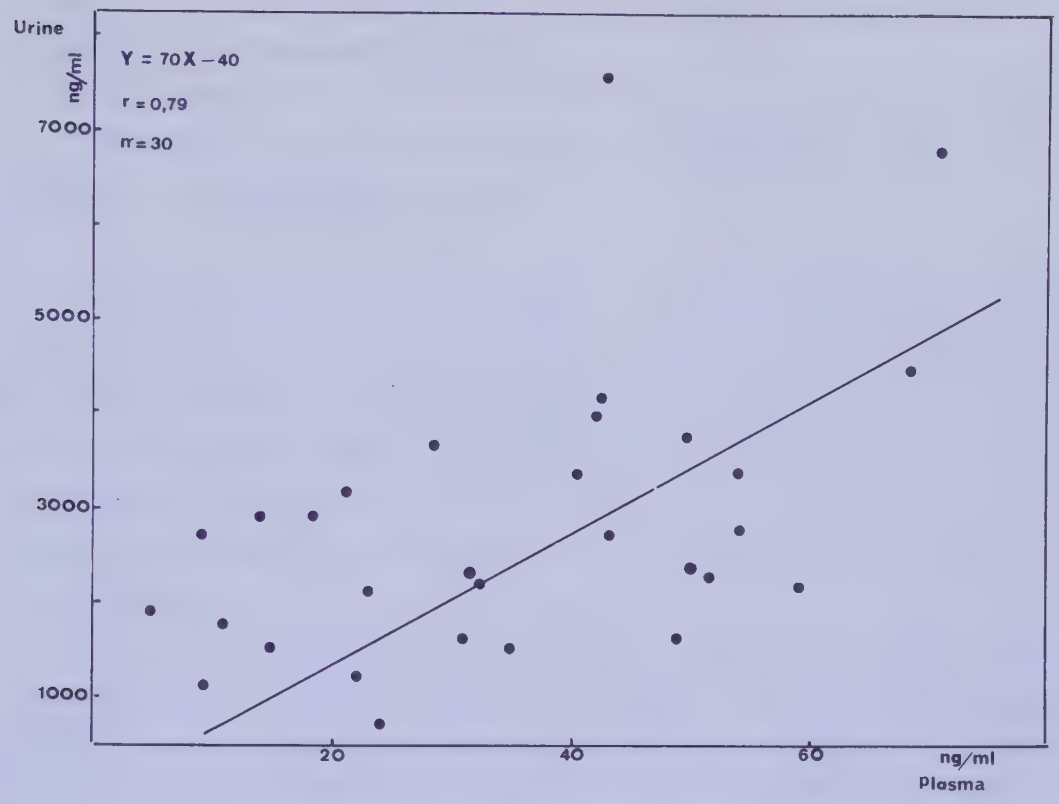


Fig. 28 Corrélation entre la progestérone plasmatique et celle de l'urine après stimulation lutéale par HCG

Les données indiquées dans ce tableau prouvent la valeur de la détermination de la progestérone urinaire lorsqu'il s'agit d'évaluer la fonction du corps jaune normal ou stimulé par différents traitements. Par contre, ce stéroïde urinaire n'est plus un indice aussi sûr des fonctions endocriniennes du corps jaune gestatif ou du placenta. Nous rediscuterons ce dernier point dans le chapitre de la grossesse humaine.

L'action de la gonadotrophine chorionique sur la production de progestérone par le corps jaune est connue depuis longtemps. Dès 1964, RICE et ses collaborateurs avaient démontré que cette production pouvait être stimulée par LH ou HCG in vitro. Le contrôle de la stimulation par HCG est le plus souvent effectué par le dosage du métabolite urinaire de la progestérone, c'est-à-dire du prégnandiol.

Les expériences de STROTT et al. (1970) ont démontré in vivo l'augmentation de la progestérone et de la 17 -hydroxy-progestérone dans le plasma après administration de HCG. De même HANSON et ses collaborateurs (1971) ont comparé l'action de LH et de HCG sur la synthèse des progestagènes circulants. Ces auteurs ont constaté une augmentation globale dans les deux cas pour la somme : "progestérone + 17-hydroxy-progestérone + 20α-hydroxy-progestérone", dont la valeur est multipliée par 2 ou 3, sans pouvoir préciser l'augmentation relative de chacun de ces stéroïdes.

Néanmoins, tout récemment, LEHMANN et ses collaborateurs (1973), après avoir étudié l'action de HCG sur la fonction lutéale, concluaient à l'insuffisance de cette stimulation simple pour le traitement des stérilités. En effet, la somme des progestagènes circulants ne dépassant pas 20 à 30 ng/ml après administration de 15.000 U.I. de HCG, l'auteur estime qu'il convient de stimuler préalablement la maturation folliculaire par HMG ou par le clomifène.

Les taux de progestérone que nous trouvons après administration de gonadotrophine sont nettement plus importants que ceux indiqués par LEHMANN.

III) INDUCTION DE L'OVULATION

Pour réaliser une induction de l'ovulation chez une femme réglée ou aménorrhéique, on effectue une stimulation séquentielle des ovaires en administrant dans une première étape une gonadotrophine à activité FSH, éventuellement associée à du clomifène. Dans la seconde étape, on déclenche l'ovulation en administrant en une seule injection 10.000 U.I. de HCG. Lorsque la stimulation séquentielle est bien standardisée, l'ovulation doit se faire 30 à 40 heures après l'injection déclenchante. L'injection unique de HCG parait préférable à un traitement plus prolongé. En effet cette manière de procéder se rapproche davantage du processus physiologique dans lequel la décharge de LH ne se produit que durant quelques heures. Ce phénomène est maintenant bien établi et chez la femme, comme chez de nombreux mammifères inférieurs, ce pic de LH est concommitant avec une valeur maximum de l'estradiol plasmatique (Van de WIELE et al. 1970(2) - ROSS et al. 1970).

Il est très important de noter que la stimulation séquentielle n'est pas sans danger et que le contrôle de la maturité folliculaire doit être effectué très sévèrement. Nous avons déjà souligné dans le chapitre se rapportant à la stimulation folliculaire par HMG, que la surstimulation pendant la phase pré-ovulatoire pouvait entraîner des conséquences graves. S'il est déconseillé de déclencher l'ovulation lorsque le follicule mature n'est pas suffisamment réceptif à l'action de HCG, il est encore plus risqué d'administrer HCG lorsque la stimulation de l'ovaire est excessive. Nous avons vu que cette estimation de la maturité folliculaire pouvait être basée, comme l'a proposé JAYLE (1968), sur la valeur des estrogènes totaux urinaires mesurés par une technique rapide sur les urines de 12 heures de nuit. L'induction de l'ovulation peut être réalisée lorsque les estrogènes exprimés en équivalents d'estrone -

par 24 heures d'urines sont compris entre 70 et 120 µg
(≪ 60 sous-dosage; > 120 surdosage).

L'exemple que nous présentons est celui d'une patiente aménorrhéique qui est devenue enceinte à la suite d'une stimulation séquentielle des ovaires.

Résultats

Le tableau XLI permet de suivre les modifications des taux des estrogènes et de la progestérone au cours de la stimulation séquentielle. Nous indiquons les valeurs obtenues avant traitement, après administration de HMG, deux jours après induction de l'ovulation par HCG, puis respectivement quatre jours et deux semaines après l'ovulation.

On peut tout d'abord noter une augmentation satisfaisante des estrogènes totaux urinaires après HMG. Comme nous l'avons constaté dans le chapitre de la stimulation folliculaire, l'élévation des estrogènes plasmatiques et notamment de l'estradiol est encore plus caractéristique. Le rapport E_2/E_1 du plasma est celui d'une période ovulatoire.

Alors que 2 et 4 jours après HCG, les estrogènes totaux urinaires restent au niveau atteint après HMG, il existe à ces mêmes périodes des variations considérables de l'estrone et surtout de l'estradiol plasmatique. On constate en effet une chute brutale le lendemain de l'ovulation provoquée, puis une remontée rapide à des taux élevés. Là encore, le rapport E_2/E_1 subit des variations caractéristiques puisqu'il chute de 2,4 à 0,7 le lendemain de l'ovulation pour remonter à 2 le 4ème jour après HCG. La progestérone urinaire et plasmatique, ainsi que le prégnandiol attestent avec certitude la présence d'un corps jaune fonctionnel.

L'installation de la grossesse est évidente dès le 15ème jour après l'induction de l'ovulation par l'augmentation rapide de toutes les valeurs hormonales.

TABLEAU XLI

STEROIDES HORMONAUX AU COURS D'UN TRAITEMENT SEQUENTIEL HMG-HCG SUIVI DE GROSSESSE

	Stéroïde	Avant traitement	12 j.après début traitement par HMG	2j. après induction ovulation HCG	4 j.après HCG	2 Semaines après ovulation
ESTROGENES	TU µg/24 h.	17	85	78	70	130
	E_3/E_2+E_1	1,12	-	1,11	0,80	0,48
	LU ng/ 24 h.					
	E_1	70	-	345	620	750
	E_2	45	-	185	345	340
	E_3	105	-	420	405	530
	E_2/E_1	0,64	-	0,53	0,56	0,45
	LP pg/ml					
	E_1	120	565	255	515	685
	E_2	55	1450	200	1060	1240
	E_2/E_1	0,46	2,38	0,72	2,06	1,8
Pregnandiol U mg/24 h.		0,8	-	2,2	12	37
Progestérone U ng/24 h.		500	-	1200	3800	4700
Progestérone P ng/ml		10,2	7,1	17,3	49,5	80,6
Testostérone pg/ml		900	770	1040	950	1500

TU = totaux urinaires LP = libres plasmatiques

LU = libres urinaires P = plasma

U = urine

Les estrogènes libres urinaires, enfin, ont subi comme ceux du plasma, une augmentation très significative au cours de la stimulation séquentielle. Il est intéressant de noter la constance des taux de l'estriol libre urinaire du 2ème au 15ème jours après HCG.

Discussion

Si l'on analyse ce qui se passe après l'ovulation dans un cycle normal, comme dans le cas de traitement séquentiel présenté ici, on constate dans les deux cas qu'après le pic ovulatoire des estrogènes plasmatiques, il y a une chute brève mais prononcée du taux de ces stéroïdes; en même temps, le rapport E_2/E_1 du plasma qui a atteint une valeur maximum à l'ovulation, chute également avant de remonter à une valeur intermédiaire entre celles de phases pré-ovulatoire et ovulatoire.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux que l'on obtient après stimulation par HCG de l'activité lutéale. Nous avions conclu à une surproduction d'estrone sous l'effet de HCG. On doit ici remarquer que lorsque la gonadotrophine chorionique est utilisée pour déclencher l'ovulation, il semble qu'elle ait des conséquences analogues sur le métabolisme des estrogènes. Pour expliquer la chute brusque du taux de l'estrone et de l'estradiol ainsi que du rapport E_2/E_1, on doit supposer ici également une production relativement plus importante d'estrone. La stimulation des cellules thécales par HCG entraîne les mêmes modifications métaboliques que LH en phase lutéale. On peut donc supposer que la décharge de LH ne modifie pas seulement quantitativement la production d'estrogènes par l'ovaire, mais encore une modification qualitative du rapport E_2/E_1.

Conclusion

Ce chapitre, consacré aux explorations dynamiques de l'ovaire, nous a permis d'établir une bonne comparaison des renseignements apportés par les analyses hormonales pratiquées dans les urines

après ou sans hydrolyse ainsi que dans la fraction libre du plasma. Nous avons pu constater :

- que les estrogènes plasmatiques sont un bon reflet de l'activité ovarienne lorsque celle-ci est stimulée pendant la phase folliculaire.

- que par contre, la transformation d'un corps jaune cyclique en un corps jaune pseudo-gestatif était très mal exprimée par ces mêmes stéroïdes, ce phénomène laissant supposer un métabolisme un peu particulier de l'estrone et de l'estradiol après HCG.

- que le rapport E_2/E_1 du plasma, à la différence de celui de la fraction libre urinaire, évoluait de manière significative au cours des différentes phases de l'activité ovarienne.

- que les estrogènes libres de l'urine, dont l'estriol, suivaient fidèlement les modifications subies par les estrogènes plasmatiques et pouvaient donc être considérés comme des indices aussi valables de l'activité thécale de l'ovaire que l'estradiol plasmatique.

- enfin, que si la progestérone plasmatique était un élément aussi important que le prégnandiol dans l'évaluation de la fonction du corps jaune, la progestérone urinaire, dont la corrélation avec la progestérone plasmatique est constamment satisfaisante au cours des différentes épreuves dynamiques, pouvait être utilisée avec confiance comme indice d'activité lutéale.

D) - STEROIDES HORMONAUX PLASMATIQUES ET URINAIRES AU COURS DE LA GROSSESSE HUMAINE

La plupart des travaux concernant les analyses hormonales au cours de la grossesse, intéressent le pregnandiol, les estrogènes urinaires ainsi que les estrogènes plasmatiques totaux et, plus récemment, les estrogènes plasmatiques libres.

La progestérone plasmatique a été évaluée par chromatographie gazeuse, notamment par Van der MOLEN (1963) et FUTTERWEIT el al (1963). D'après ces auteurs, les taux de progestérone sont nuls ou très faibles au cours du premier trimestre et très dispersés pendant les trimestres suivants. Les radiodosages donnent des valeurs plus importantes et plus concordantes pour la progestérone au cours de la grossesse. Citons par exemple les taux donnés par YOUSSEFNEJEDIAN et al en 1972 (de 40 à 230 ng/ml), par TULCHINSKY et al. la même année (de 25 ng/ml à la 12ème semaine à 180 ng/ml en fin de grossesse), par PICHON et MILGROM en 1973 (de 15 ng à 6 semaines à 120 ng à 34 semaines). Les valeurs données par HOLMDAHL et JOHANSSON (1972) sont du même ordre de grandeur.

Les estrogènes libres plasmatiques ont été évalués par fluorométrie au dernier trimestre de la grossesse (MARTIN, 1963 - SMITH et ARAI, 1963 - SCHWERS, 1964 - TOUCHSTONE et MURAWEC, 1965). La répartition respective de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol dans cette fraction libre du plasma est différente suivant les auteurs. SVENDSEN et SORENSEN (1964) ont analysé par double dilution isotopique les taux d'estrone et d'estradiol libres plasmatiques depuis la 9ème semaine de la grossesse. Leurs résultats démontrent une variabilité considérable des taux d'un sujet à l'autre, avec cependant une augmentation progressive jusqu'à un maximum (de 15800 pg/ml pour E_1 et 32000 pg/ml pour E_2) à la 32ème semaine, puis une diminution ultérieure jusqu'à l'accouchement.

Les radiodosages, enfin, ont été appliqués notamment par WU et LUNDY (1971) ainsi que par TULCHINSKY et al.(1972) à la détermination des estrogènes libres plasmatiques au cours de la grossesse. Les

résultats de ces deux derniers auteurs ne sont pas très concordants et ne concernent pas les 12 premières semaines de la grossesse, c'est-à-dire la période où l'activité ovarienne est prépondérante par rapport à l'activité placentaire.

Nous envisagerons séparément ces premières semaines de la grossesse qui, nous le verrons, se différencient de manière très nette des deux trimestres suivants.

1) Stéroides hormonaux au cours du premier trimestre

Résultats

Sur les figures 29a et 29b, nous avons déssiné les tracés des estrogènes libres et de la progestérone plasmatiquesd'une part, urinaires d'autre part, de la 5ème à la 16ème semaines après les dernières règles. Les valeurs moyennes ont été regroupées par deux semaines, chaque point représentant 3 à 12 grossesses différentes. Le tracé des stéroïdes plasmatiques (fig. 29a) montre :

- pour la progestérone, un plateau de la 5ème aux 11/12èmes semaines puis une montée rapide à partir de la 13ème semaine.
- l'estrone et l'estradiol augmentent lentement jusqu'aux 9/10èmes semaines, puis aux 11ème/12ème semaines on voit une rupture de pente très importante, notamment pour l'estradiol dont les taux passent en deux semaines de 1 ng environ à plus de 3ng. Le rapport E_2/E_1 qui est de 2,1 aux 5ème/6ème semaines passe à près de 3 aux 11ème/12ème semaines.
- l'estriol, enfin, n'est pas détectable dans les premières semaines de grossesse. Ce n'est qu'aux 13/14èmes semaines que cet estrogène devient mesurable et sa progression est alors très rapide puisqu'en deux semaines il passe de 200 à 950 pg/ml.

Sur le tracé des stéroïdes urinaires (fig. 29b), la progestérone accuse un profil en dents de scie témoignant une augmentation globale très accidentée. Le profil des estrogènes est par contre très caractéristique : une augmentation peu nette jusqu'aux 11/12èmes semaines puis une cassure aux 13/14èmes semaines pour chaque estrogène.

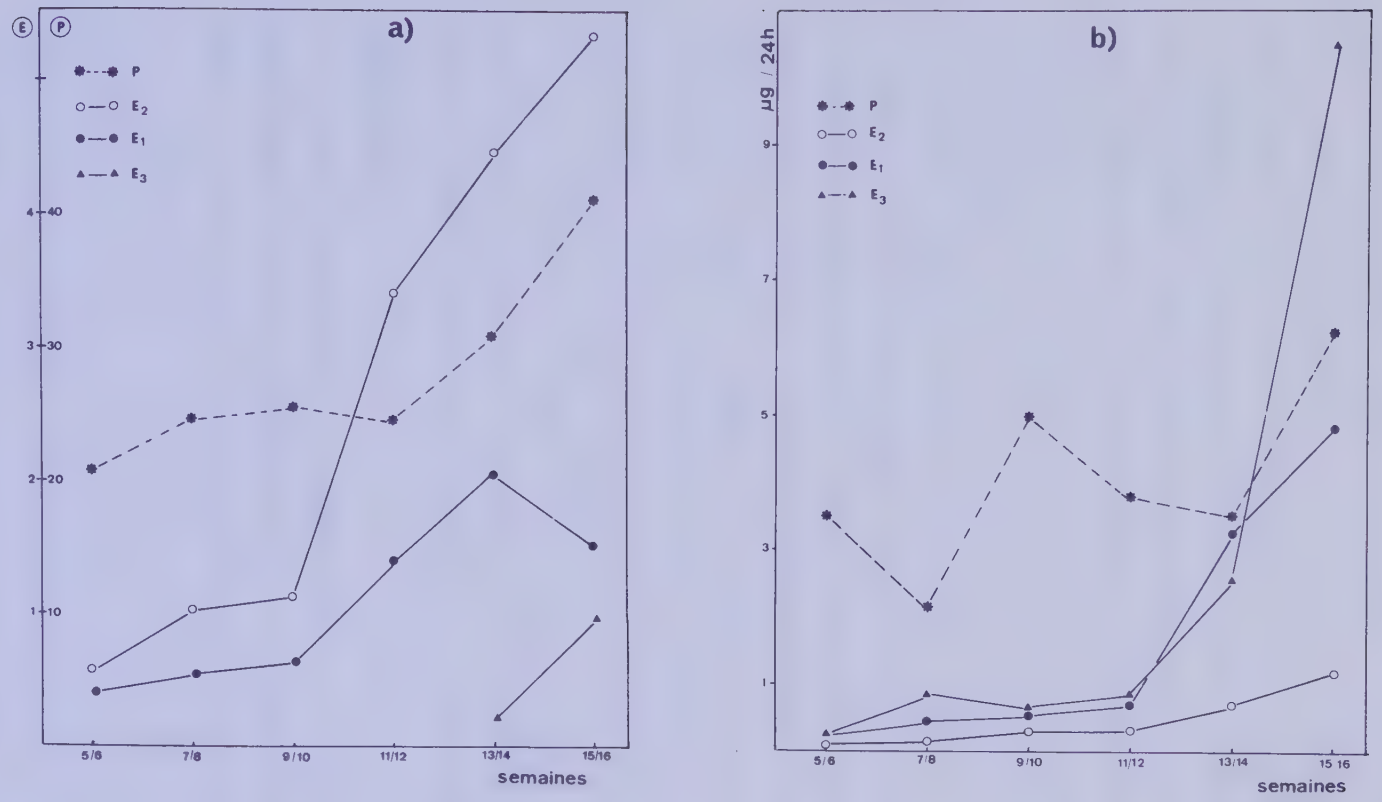


Fig. 29 a et b Tracés des stéroides libres au cours des 16 premières semaines de la grossesse normale

a) dans le plasma (ng/ml); b) dans l'urine (µg/24h)

E_1=estrone; E_2= estradiol; E_3= Estriol; P = progesterone

Le tracé de l'estriol se détache de celui des autres estrogènes. Entre les 11ème et 14ème semaines, sa concentration augmente plus de 10 fois. Les clearances moyennes de E_1 et E_2 aux 13ème/14ème semaines sont respectivement de 1,48 et 0,16 ml/min. Celle de l'estriol est beaucoup plus forte puisqu'elle est de 8,5 ml/min.

Avant de discuter les résultats qui viennent d'être présentés, nous décrirons le cas particulier d'une patiente dont la grossesse a débuté après induction de l'ovulation par HMG-HCG (fig.30a et 30b). Sur le profil des stéroïdes plasmatiques (fig. 30a) la progestérone se remarque par des oscillations brutales à des taux très élevés, 2 à 4 fois plus forts que ceux indiqués pour une grossesse normale. L'estrone et l'estradiol sont également très élevés; leur profil très caractéristique montre une forte chute à la 9ème semaine, puis ces deux estrogènes subissent la même forte augmentation constatée à partir de la 12ème semaine pour les grossesses normales. L'estriol plasmatique apparait à la 12ème semaine. Il est très curieux de constater que sur le profil des estrogènes libres urinaires, on retrouve le même accident à la 9ème semaine que celui observé dans le plasma. Puis de nouveau, c'est à la 12ème semaine qu'on retrouve la brusque élévation des taux des estrogènes libres comme de ceux des estrogènes totaux urinaires. Le prégnandiol urinaire, enfin, qui a atteint une valeur record après induction de l'ovulation, suit une pente négative jusque vers la 12ème semaine et ce n'est qu'à la 14ème semaine que les taux se redressent.

Discussion

Dans l'ensemble, la progestérone et ses métabolites, les estrogènes libres plasmatiques et urinaires sont du même ordre de grandeur que ceux du corps jaune pseudogestatif.

Quel que soit le stéroïde hormonal que l'on évalue, dans les urines comme dans le plasma, on trouve entre la 11ème et la 13ème semaines, des modifications dans la pente des tracés, qui laissent supposer un évènement physiologique important à cet âge de la grossesse. Ces modifications se retrouvent dans les tracés moyens comme dans les cas individuels :

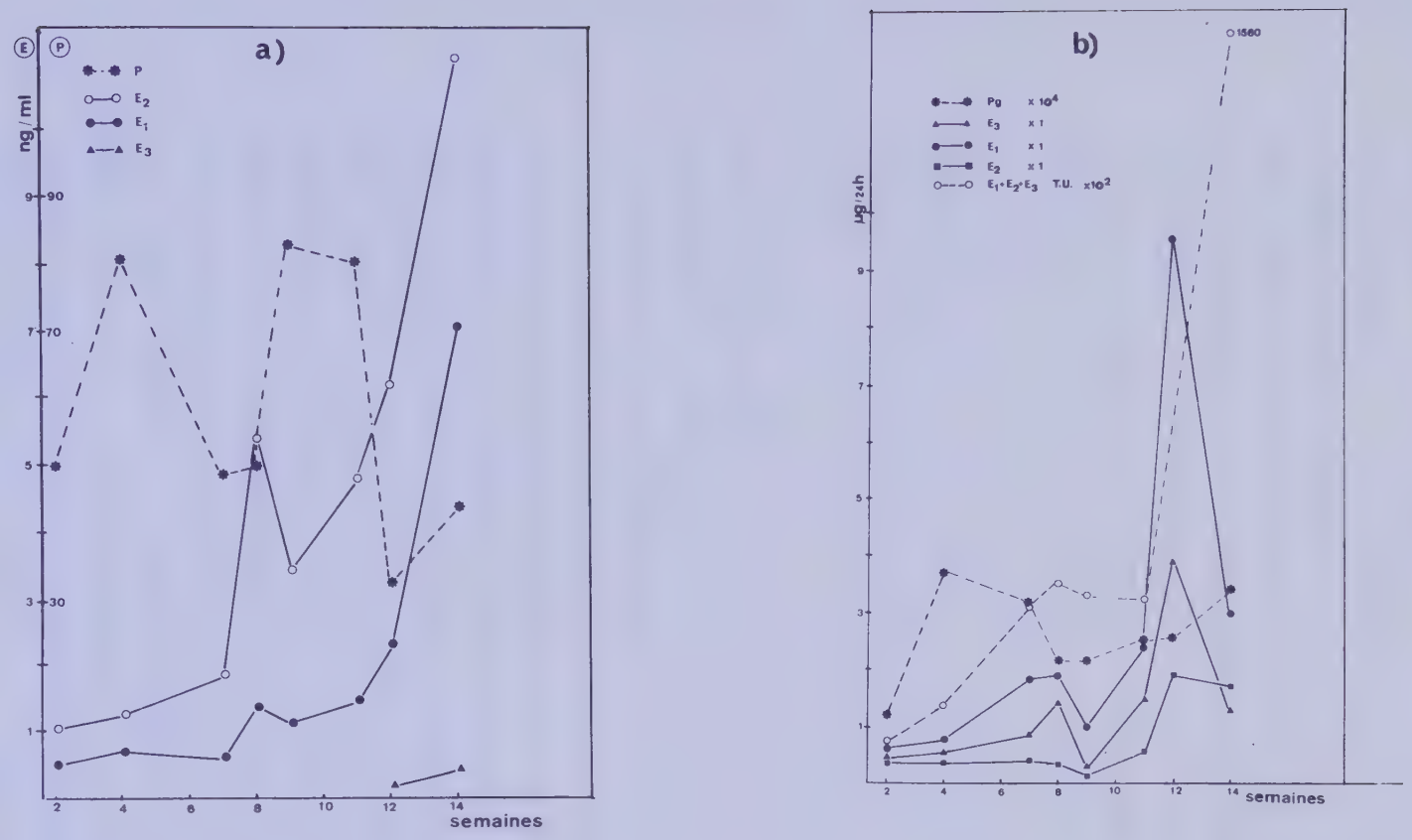


Fig.30a et 30b Stéroides plasmatiques (30a) et urinaires (30b) au cours des premières semaines de grossesse chez une femme enceinte après induction de l'ovulation par traitement séquentiel HCG-HMG

P= progesterone plasmatique; E_1= estrone libre; E_2= estradiol libre; E_3= estriol libre; Pg = pregnandiol; E_1 + E_2+ E3 TU = estrogènes totaux urinaires

- l'estrone et l'estradiol plasmatiques montrent une rupture très nette de leur tracé dès les 11ème/12ème semaines, la somme E_1+E_2 passant de 2 à 5,5 ng/ml de plasma. TULCHINSKY et al. (1972) ne trouvent pas d'estrone plasmatique avant la 18ème semaine. Pour l'estradiol il observe un tracé progressif de la 8ème à la 17ème semaine. L'estriol ne devient détectable pour cet auteur qu'à partir de 15 semaines, avec des taux de 1,5 à 2 ng/ml. C'est à la 13ème semaine que de notre côté, nous commençons à mesurer de l'estriol libre dans le plasma.

- dans l'urine, une cassure des tracés de l'estrone et de l'estradiol libre, est également très perceptible. Mais il faut surtout noter l'accroissement considérable de l'estriol libre urinaire, déjà à la 13ème mais encore plus aux 15ème/16ème semaines, les taux passant de 2,5 à 10,5 µg/24 heures.

Il avait déjà été constaté par JAYLE (1963) que sur un tracé résultant de 4.500 analyses hormonales, une forte dénivellation du profil des estrogènes totaux urinaires, se produisait entre la 14ème et la 15ème semaines.

- d'autre part, si les variations de la progestérone urinaire sont assez peu significatives, le tracé de la progestérone plasmatique est nettement plus intéressant ; alors que le stéroïde demeure à un niveau sensiblement constant pendant les 12 premières semaines, son tracé s'élève soudain aux 13ème-14ème semaines après les dernières règles. Nos valeurs de progestérone plasmatique peuvent être comparées à celle de JOHANSSON (1969, 1972) : cet auteur trouve pour ce stéroïde une pente légèrement négative de 5 à 10 semaines, les taux allant de 27 à 15 ng/ml, puis au-delà de la 10ème semaine, la pente s'inverse et les taux montent brusquement à 40 ng/ml à la 14ème semaine. La 17-hydroxy-progestérone mesurée simultanément par JOHANSSON (HOLMDAHL et JOHANSSON, 1972), s'élève progressivement jusqu'aux 8/9èmes semaines pour diminuer ensuite jusqu'à des taux très bas. De même, TULCHINSKY et al (1972) notent une élévation nette des taux de progestérone à partir de la 13ème semaine. Le profil du prégnandiol urinaire, en palier

pendant une dizaine de semaines puis en élévation progressive à partir de la 13ème semaine est en accord avec ces résultats.

Les expériences de YOSHIMI et al. (1969) ont permis à cet auteur, en se basant sur l'évolution de tracé de la progestérone et de la 17-hydroxy-progestérone, d'évaluer la durée du corps jaune fonctionnel au cours de la grossesse à 8 semaines après la fécondation.

En conclusion, les tracés du prégnandiol et des estrogènes totaux urinaires subissent une modification de leur pente entre la 11ème et la 13ème semaines de la grossesse. C'est à cette époque que l'on constate une brusque élévation de l'estradiol et de l'estrone plasmatiques. Comme par ailleurs le corps jaune gestatif à la 5ème/6ème semaines de la grossesse a une activité endocrinienne voisine de celle du corps jaune pseudo-gestatif obtenu par administration de 1.500 U.I. de HCG (de LAUZON et al. 1973), on peut conclure avec beaucoup de vraisemblance que jusqu'à la 10ème semaine, la source de la progestérone et des estrogènes est essentiellement ovarienne. L'activité stéroïdogène du placenta entrerait donc en jeu entre la 10ème et la 12ème semaines, époque à laquelle le rapport E_2/E_1 passe de 2 à 3 dans le plasma. Cette activité s'affirme au-delà de la 14ème semaine. C'est à cette époque également que le taux de l'estriol subit une augmentation importante, témoignant d'une activité métabolique liée au développement du compartiment foetal. Au cours de la 15ème et de la 16ème semaines, les tracés généraux ou individuels font apparaître une inflation des stéroïdes, qui se ralentit par la suite.

2) Deuxième partie de la grossesse

Résultats

Sur les figures 31 à 33, nous avons représenté les tracés pour toute la grossesse

- des fractions E_1, E_2 et E_3 libres plasmatiques (fig. 31)
- des fractions E_1, E_2 et E_3 libres urinaires ainsi que des estrogènes totaux urinaires (fig. 32)
- de la progestérone urinaire, de la progestérone plasmatique et du prégnandiol urinaire (fig. 33).

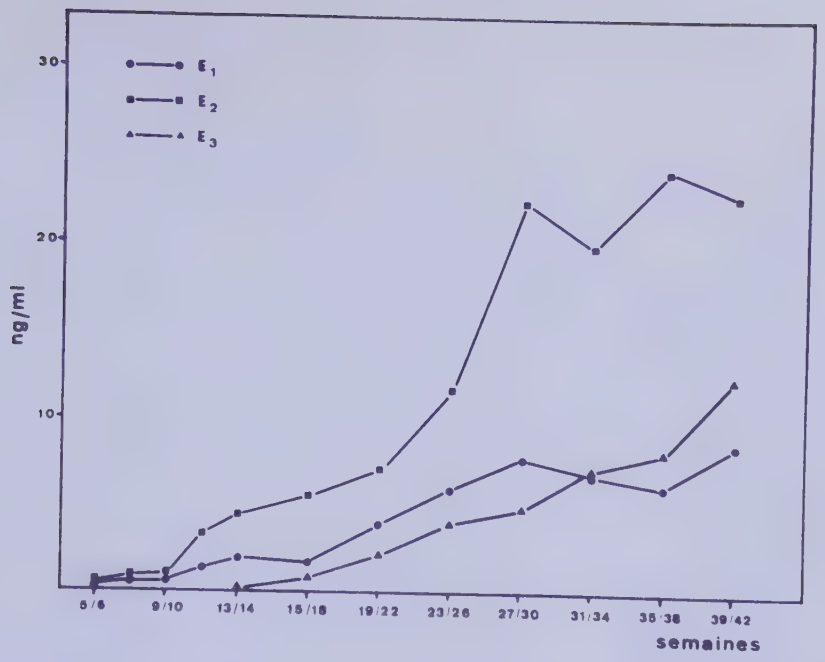


Fig.31 Tracés des estrogènes libres plasmatiques au cours de la grossesse (moyennes de 3 à 12 grossesses individuelles en chaque point)
E_1=estrone; E_2=estradiol; E_3=estriol

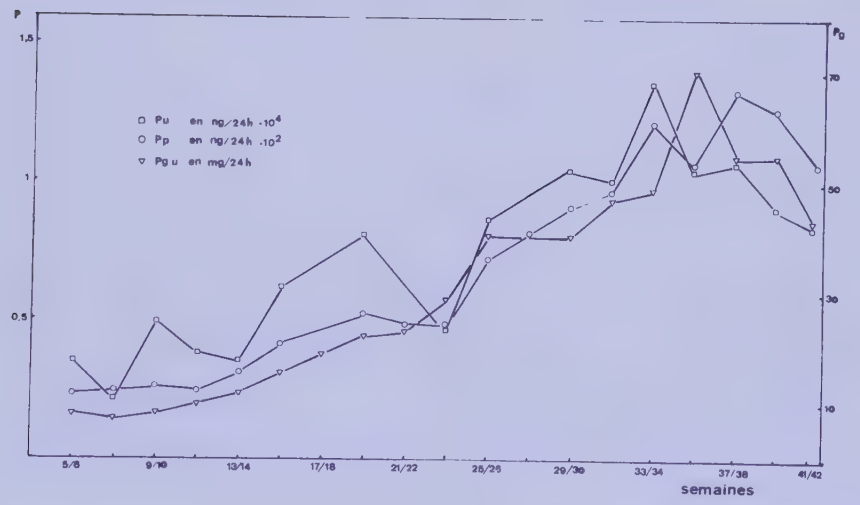


Fig. 33 Tracés du pregnandiol urinaire (PgU.), de la progestérone urinaire (P U.) et plasmatique (Pp) au cours de la grossesse (moyennes de 3 à 12 grossesses individuelles en chaque point)

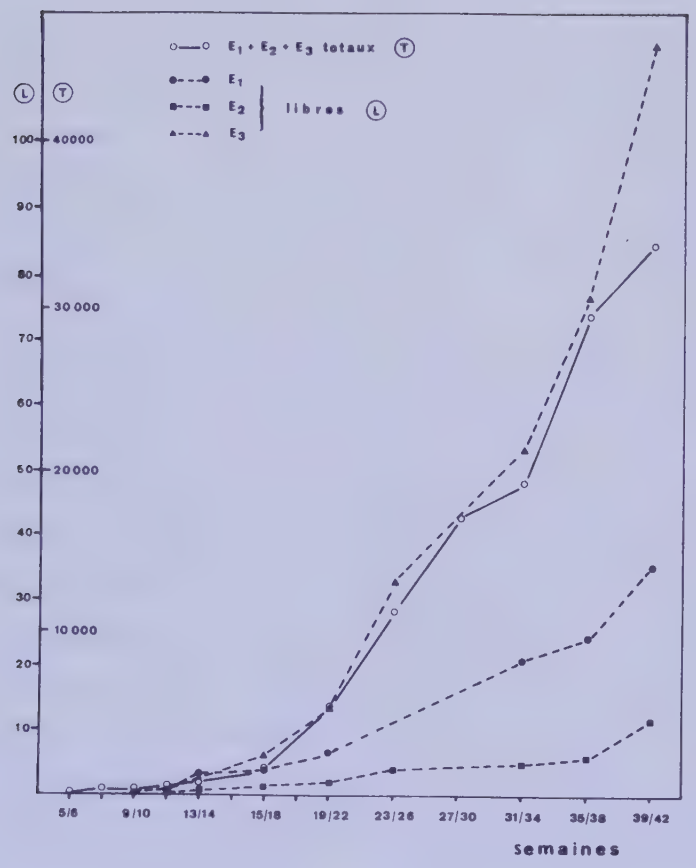


Fig. 32 Tracés des estrogènes libres (L) et totaux (T) urinaires (g/24h) au cours de la grossesse (moyennes de 3 à 12 grossesses individuelles en chaque point)

o Les estrogènes de la fraction libre plasmatique subissent une augmentation régulière depuis la 13ème semaine environ où nous avions constaté plus haut une rupture de pente, jusqu'à 24 ou 25 semaines. Ensuite, pour l'estriol comme pour l'estrone et l'estradiol, le tracé devient plus irrégulier avec cependant une élévation globale assez forte puisque les taux passent de la 25ème semaine jusqu'à terme de 16 à 26 ng/ml pour $E_1 + E_2$ et de 6 à 15 ng/ml pour E_3. Le rapport E_2/E_1 qui s'était élevé à 3 vers la 14ème semaine, évolue assez peu durant le reste de la grossesse, oscillant entre 2,5 et 4.

o Dans la fraction libre de l'urine, le profil de l'estrone et de l'estradiol demeure inchangé, jusqu'à 22 semaines approximativement. A ce moment, on observe une forte élévation de ces estrogènes puisqu'en 4 semaines, les taux pour $E_1 + E_2$ passent de 8 à près de 35 µg/24 h. Après cette brusque montée, ces estrogènes ne sont plus modifiés jusqu'au terme. Le rapport de l'estradiol et de l'estrone libre dans l'urine n'évolue pas plus au cours de la grossesse qu'au cours du cycle. L'estrogène important de la fraction libre urinaire semble bien être l'estriol. En effet celui-ci dont les taux ont fait un bond à la 15ème semaine, poursuit une progression rapide qui le fait se détacher très nettement des deux autres estrogènes. La pente s'accélère encore à partir de la 33ème semaine et, à terme, les taux qui ont atteint 110 µg/24 h. sont 44 fois plus élevés que ceux mesurés aux 13ème et 14ème semaines.

La clearance moyenne de l'estriol dont les valeurs varient de 4 à 20 ml de plasma par minute suivant les individus n'est pas modifiée de manière significative au cours de la grossesse. Cependant, elle est constamment 10 à 12 fois plus importante que celle de l'estradiol et 2 à 5 fois plus élevée que celle de l'estrone; ces deux dernières s'élèvent significativement au dernier mois de la grossesse (0,58 pour E_2 et 5,96 pour E_1 en moyenne).

o Si nous comparons les tracés de la progestérone plasmatique et du pregnandiol urinaire, on peut constater un parallélisme étonnant dans leur évolution. Les taux de ces deux stéroïdes qui sont restés stationnaires jusque vers la 13ème semaine, s'élèvent

ensuite jusqu'à la 20ème semaine. A cette époque les taux du pregnandiol et de la progestérone sont respectivement 5 fois et 3 fois plus importants que ceux de la phase lutéale normale. Après un ralentissement de 3 à 4 semaines dans la progression de la progestérone et de son métabolite urinaire, on constate une nouvelle augmentation à peu près régulière jusqu'à un maximum atteint entre les 35ème et 37ème semaines. Les taux sont alors de 135 ng/ml pour la progestérone et de 70 µg/24 h. pour le prégnandiol, témoignant d'une progression globale de 8 et de 17 respectivement par rapport aux valeurs de la phase lutéale. Durant le dernier mois de la grossesse, les tracés de ces deux stéroïdes accusent une chute significative.

Si la progestérone urinaire a un tracé grossièrement analogue à celui des stéroïdes précédents, le profil témoigne de fortes irrégularités dans son évolution. La valeur maximum de 14 µg/24 h. aux 33/34èmes semaines indique cependant une progression d'un facteur 10 par rapport à la valeur de la phase lutéale. A cette période, la clearance moyenne de la progestérone est de 0,08 ml de plasma par minute.

Discussion

Les taux d'estrone, d'estradiol et d'estriol libres plasmatiques obtenus par différents auteurs pour les 2ème et 3ème trimestres de la grossesse ont été indiqués dans le tableau XLIII.

Il y a peut de concordance entre nos résultats et ceux de WU et LUNDY (1971). En effet, contrairement à nos propres observations, seul, d'après ces auteurs, l'estriol augmente entre la 12ème et la 24ème semaines de grossesse. Cette augmentation est d'ailleurs relativement faible. Par contre les taux donnés pour la fin de la grossesse sont très supérieures aux nôtres.

Les résultats obtenus pas SCHWERS (1964) par fluorométrie, par KORENMAN (1970) ainsi que par TULCHINSKY et al.(1972) par des méthodes de radiocompétition sont analogues entre eux et avec nos propres résultats.

TABLEAU XLIII

TAUX DES ESTROGENES PLASMATIQUES (ng/ml) AU COURS DE LA GROSSESSE, DONNES DANS LA LITTERATURE.

Age de la grossesse	Auteur	Estrone ng/ml	Estradiol ng/ml	Estriol ng/ml
Vers 12 semaines	K.	-	1,7 ± 0,9	-
	S.	0,1-0,9	0 - 21	-
	W.	1,2 ± 0,05	2,9 ± 0,2	0,3 ± 0,02
	T.	--	2,5-3	-
	TP	1,4 ± 0,5	3,4 ± 1,0	traces
16 - 20 semaines	K.	-	4,2 ± 2	-
	S.	0,3 - 1,2	0,6 - 6,6	-
	T.	1,5 - 2	4,5 - 8,5	2 - 2,5
	TP	1,5 -3,3	5,3 - 7	0,9 - 2,5
24 - 28 semaines	K.	-	10,2 ± 2,4	-
	T.	3,5 - 5	8 - 12	6 - 7,5
	S.	5,5 - 8,2	1,5 - 16,2	-
	W.	0,9 ± 0,06	2,5 ± 0,09	1,2 ±-0,1
	TP	6,8 - 7,0	11,1 - 18,1	4,0 -5,4
28 - 32 semaines	K.	-	11,7 ± 0,6	-
	S.	2,6 -4,1	5,5 - 32,0	-
	T.	4,5 - 9	9 - 12	6,5 - 8,5
	Sch.	4,6	11,9	6,2
	TP	4,6 - 7,9	17,5 - 21,8	4,6 - 7,9
36 semaines à terme	K.	-	15,7 ± 5,6	-
	S.	2,4 - 11,2	6,0 - 23,3	-
	T.	6,5 - 9,0	14,0 - 17,0	10,0 - 15,0
	W.	12,2 ± 0,8	35,1 ± 2,4	14,2 ± 1,2
	Sch.	4,9	12,7	11,9
	TP	6,1 - 9,4	18,3 - 21,8	6,0 - 14,8

S = Svenden et Sorensen (1964)
Sch. = Schwers (1964)
K. = Korenman et al. (1970)
T. = Tulchinsky et al. (1972)
W. = Wu et Lundy (1971)
T.P. = Travaux personnels

En ce qui concerne la progestérone plasmatique, les taux que nous avons indiqués (fig. 33) sont du même ordre de grandeur que ceux de la littérature. Notamment, nous n'avons trouvé, comme YOSHIMI (1969), JOHANSSON (1972) et TULCHINSKY (1972), une augmentation significative de ce stéroïde qu'au-delà de la 12ème semaine. Les taux moyens de 100 à 150 ng/ml que nous avons trouvés en fin de grossesse, sont un peu plus faibles que ceux de 230 ng/ml donnés par YOUSSEFNEJEDIAN et al.(1972) mais identiques à ceux de TULCHINSKY (1972) ou de PICHON et MILGROM (1973).

Nous ne pouvons nous référer à la littérature en ce qui concerne les taux des estrogènes et de la progestérone libres urinaires, ces données y étant, à notre connaissance, inexistantes (DESFOSSES et al., 1973). Cependant c'est à partir de l'ensemble des déterminations que nous avons effectuées dans l'urine et dans le plasma que nous pouvons mettre en relief quelques points intéressants :

- le profil de la progestérone dans le plasma est une reproduction fidèle de la courbe en sigmoïde étirée, maintes fois décrites (VENNING, 1938 - SHEARMAN, 1959 - JAYLE, 1962) pour le prégnandiol urinaire. Un déclin caractéristique déjà noté pour le prégnandiol par COYLE et al.(1956) et par SHEARMAN (1959) pendant le dernier mois de la grossesse est également retrouvé dans le tracé de la progestérone. Nous avons tracé la droite de régression des valeurs du prégnandiol et de la progestérone (fig. 34). L'équation de cette droite est : $y = 0,44\ x - 0,18$. Le coefficient de corrélation est $r = 0,82$.

La progestérone plasmatique, provenant essentiellement du placenta peut donc être utilisée au même titre que son métabolite urinaire comme indice de l'activité de cette glande endocrine au cours de la grossesse. Il n'en est pas de même de la progestérone urinaire. La corrélation entre les valeurs de la progestérone de l'urine et celle du plasma n'est en effet que de 0,43 et nous avons pu noter dans le tracé du stéroïde urinaire de fortes irrégularités.

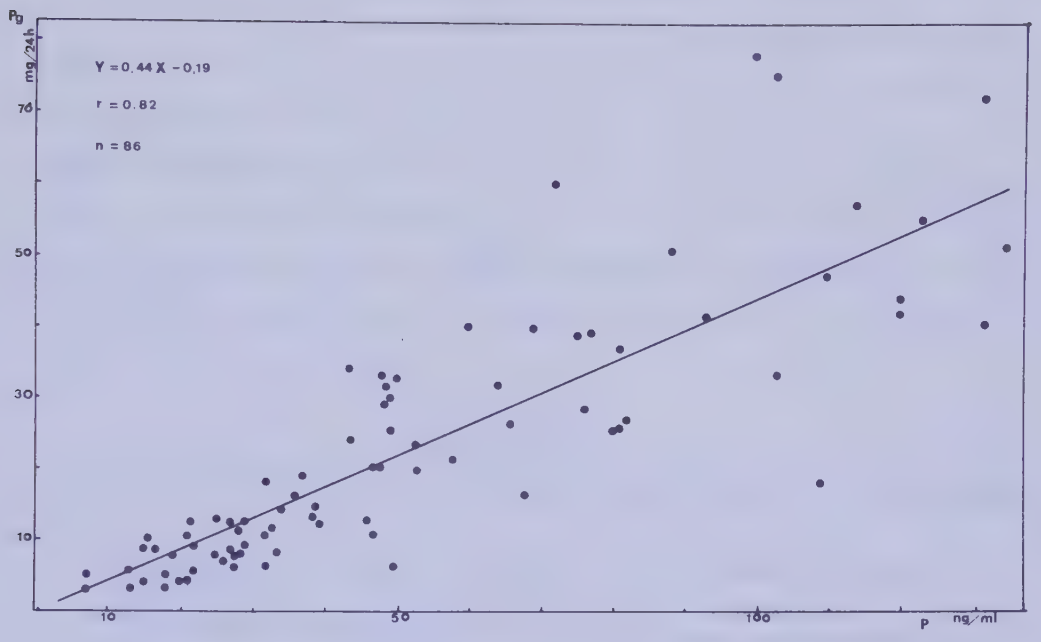


Fig. 34 Corrélation entre le prégnandiol urinaire(Pg) et la progesterone plasmatique(P) au cours de la grossesse

Si la progestérone urinaire s'est révélée un bon indice de l'activité du corps jaune cyclique ou pseudo-gestatif, il semble par contre peu intéressant de l'analyser au cours de la grossesse.

- Les résultats présentés par TULCHINSKY et al. (1972) concernant les estrogènes libres et la progestérone plasmatique au cours de la grossesse sont accompagnés de l'analyse mathématique de rapports entre ces stéroïdes hormonaux. Notamment, les rapports E_2/E_3 et P/E_3 seraient, d'après cet auteur, constants à partir de la 20ème semaine de la grossesse jusqu'à terme, les valeurs respectives allant de 0,5 à 4,2 pour E_2/E_3 et de 5 à 37 pour le 2ème rapport. Nous avons calculé ces mêmes rapports à différentes étapes de la grossesse à partir des 13/14ème semaines. Les résultats sont indiqués dans le tableau XLIV.

TABLEAU XLIV

RAPPORTS E_2/E_3 ET P/E_3 DU PLASMA AU COURS DE LA GROSSESSE

Semaines de grossesse	E_2/E_3	P/E_3
13 - 14	21	152
15 - 16	5,6	44
19 - 20	2,8	21
25 - 26	2,0	13,6
31 - 32	2,9	13,1
35 - 36	2,9	11,2
39 - 40	2,9	11,6

E_2 = estradiol; E_3 = Estriol ; P = progestérone

Nous constatons, comme TULCHINSKY, que les valeurs sont très constantes depuis 19 à 20 semaines pour le rapport E_2/E_3 et depuis 25 à 26 semaines pour le rapport P/E_3. Nos valeurs sont comprises dans les valeurs extrêmes données par TULCHINSKY. Cependant, on peut observer que ces rapports accusent une forte diminution avant la 20ème semaine. Ceci est probablement en rapport avec des modifications métaboliques qui se produisent dans le compartiment

foeto-placentaire entre les 12ème et 20ème semaines.

Avec TULCHINSKY, nous pouvons conclure à l'intérêt des relations entre l'estradiol, l'estriol et la progestérone libre du plasma dont l'un implique des précurseurs à la fois maternel et foetal, l'autre des précurseurs essentiellement foetaux, le 3ème enfin reflètant à la fois les compartiments maternel et placentaire. L'intégrité de l'unité materno-foeto-placentaire serait confirmée par des valeurs normales de ces rapports tandis qu'une éventuelle anomalie de l'un des compartiments devrait être immédiatement traduite par une valeur anormale de l'un ou l'autre des deux rapports.

- Parmi les fractions estrogènes que nous avons analysées au cours de notre étude, l'estriol libre urinaire semble particulièrement intéressant par rapport aux autres estrogènes libres de l'urine ou du plasma. En effet, au-delà de la 15ème semaine, c'est l'estriol urinaire qui devient l'estrogène libre prépondérant. De plus, son parcours durant la grossesse est très régulier et n'accuse pas les oscillations que nous avons pu observer dans celui de l'estrone ou de l'estradiol : de la 15ème semaine jusqu'au terme, on peut distinguer deux pentes dans le tracé, une cassure nette se produisant vers la 33ème semaine. En effet, les concentrations doublent entre la 33ème semaine et le terme. Au moment de l'accouchement, les taux de l'estriol libre urinaire sont près de 1.000 fois plus importants qu'au moment de la phase lutéale normale. Ce chiffre n'est pas sans rappeler celui, analogue, de l'augmentation de l'estriol total urinaire pendant la grossesse.

La figure 32, décrite plus haut, présentait, outre le tracé des estrogènes libres urinaires, celui des estrogènes totaux urinaires étudiés dans la même population. L'analogie entre ce dernier profil et celui de l'estriol libre urinaire est frappante. On a pu mettre en évidence une très bonne corrélation entre ces deux catégories de valeur puisque le coefficient r est de 0.92.

L'évolution des tracés de l'estrone et de l'estradiol libres urinaires est beaucoup moins intéressante. En effet, on ne constate que très peu de modifications entre les 23/24èmes semaines de grossesse et le terme. Le rapport de ces deux estrogènes est toujours constant, en dehors comme au cours de la grossesse. L'augmentation globale par rapport à la phase lutéale n'est que de 150 pour $E_1 + E_2$, soit du même ordre de grandeur que celle de $E_1 + E_2$ dans la fraction conjuguée. Les clearances métaboliques de E_1 et E_2 sont 4 à 12 fois plus faibles que celle de l'estriol.

Pour comprendre cette divergence entre les trois estrogènes, on peut évoquer la surproduction de l'estriol par le compartiment foetal, sa forte polarité ainsi que sa faible liaison avec les protéines plasmatiques.

L'ensemble des observations que nous avons pu effectuer au sujet de l'estriol libre urinaire font de cet estrogène un élément important dans le contrôle biochimique de la grossesse. Ce fait éclaire d'un jour nouveau l'intérêt de posséder un immunsérum anti-estriol de haute spécificité tel que celui que nous avons décrit dans la deuxième partie de notre travail.

Cet immunsérum permettrait par l'analyse rapide de l'estriol libre, sur l'extrait brut d'un volume très faible ($\leq$ 1 ml) d'urine fraîche, d'avoir un reflet presque instantané de la vitalité foetale.

En conclusion de cette étude sur les activités endocriniennes au cours de la grossesse humaine, quelques faits peuvent être soulignés :

- CHacun des tracés hormonaux que nous avons étudiés, confirme par son évolution caractéristique que jusqu'à la 10ème semaine de la grossesse, seul l'ovaire est responsable de la production hormonale. La participation ultérieure du placenta puis du foetus à cette activité est démontrée par le changement de pente des différents profils.

- La progestérone plasmatique qui, grâce aux techniques modernes de radiocompétition, peut être facilement déterminée dans n'importe quelle circonstance physiologique, est un critère aussi précieux que le prégnandiol de l'activité du corps jaune gestatif et du placenta.

- les estrogènes plasmatiques apportent des renseignements différents de ceux donnés par la progestérone puisqu'ils reflètent plus largement l'unité materno-foeto-placentaire.

- L'estriol libre urinaire enfin, par sa progression régulière et particulièrement importante, se révèle un atout aussi précieux que les estrogènes totaux urinaires, dans le contrôle de la grossesse.

CHAPITRE II

STEROIDES HORMONAUX PLASMATIQUES CHEZ LA RATTE ET CHEZ LE COBAYE.

Il n'est pas dans notre intention de faire une revue générale de toutes les données de la littérature sur la physiologie de la reproduction. Nous nous bornerons à rappeler les principaux travaux qui intéressent la physiologie de la ratte et du cobaye et nous ferons une brève allusion aux primates.

Les principales données de la littérature intéressant les hormones de la reproduction chez la ratte concernent le dosage des estrogènes et de la progestérone dans le sang veineux ovarien au cours du cycle ou au cours de la gestation. Les méthodes utilisées pour les estrogènes sont soit des méthodes biologiques (YOSHINAGA et al. (1969), WAYNFORTH et al. (1972)$_1$), soit la technique de chromatographie gazeuse (NIMROD et al. (1971)), soit encore le radio-immunodosage (SHAIKH, 1971). Il faut encore citer EXLEY qui a appliqué la méthode de radiocompétition à la détermination de l'estradiol libre dans le sang périphérique au cours du cycle de la ratte (EXLEY, 1969; BROWN GRANT et al., 1970).

Des données concernant la progestérone ont été apportées par HASHIMOTO et ses collaborateurs en 1968. Ces auteurs utilisant la technique de chromatographie gazeuse ont étudié la production de progestérone dans le sang périphérique et dans le sang de la veine efférente de l'ovaire aussi bien par le corps jaune cyclique que par le corps jaune pseudo-gestatif ou gestatif.

LECLERCQ et al. (1971) ainsi que MORISHIGE et al, en 1973, ont pu apprécier les variations de la progestérone circulante au cours de la gestation, en appliquant la technique de radiocompétition.

Nous avons repris ces différentes études en comparant, grâce aux techniques de radiocompétition, les taux d'estrogènes et de progestérone dans le sang périphérique et le sang veineux ovarien d'une part, dans le plasma des foetus d'autre part. Nous avons également recherché l'action de la castration réalisée en fin de grossesse ainsi que celle de l'administration de gonadotrophine

chorionique pendant plusieurs jours à partir de l'estrus. Nous avons ainsi espéré compléter nos connaissances chez la ratte.

Par ailleurs, si CHALLIS, HEAP et ILLINGWORTH ont bien étudié les variations de la progestérone surtout, des estrogènes accessoirement, dans le sang périphérique du cobaye au cours du cycle et de la gestation (CHALLIS et al, 1971)- HEAP et al. 1973), ces auteurs n'ont pas cherché à connaitre les concentrations de ces mêmes stéroïdes au cours de la gestation dans le sang embryonnaire et dans le liquide amniotique.

Il nous a paru intéressant de déterminer les concentrations respectives de l'estrone, de l'estradiol et de la progestérone dans ces différents liquides biologiques et de pouvoir ainsi comparer la production hormonale du cobaye et de la ratte.

I) - MATERIEL ET METHODES

a) Un total de 110 rattes "Long Evans", pesant de 200 à 300 g, ont été utilisées pour cette étude.

- Pendant le cycle normal et pendant la pseudogestation, des frottis vaginaux ont été pratiqués quotidiennement : le proestrus était caractérisé par la présence de cellules épithéliales nuclées; l'estrus par des cellules épithéliales kératinisées essentiellement; le diestrus enfin par la présence prépondérante de leucocytes.
- Nous avons pris pour jour 0 de la gestation le jour où des spermatozoïdes sont trouvés dans les frottis vaginaux.
- La pseudo-gestation a été provoquée chez une douzaine de rattes par administration quotidienne de 100 U.I. de gonadotrophines chorioniques à partir de l'estrus pendant 5 à 10 jours.
- Une douzaine de rattes gestantes de 18 à 20 jours ont été ovariectomisées; le sacrifice de ces animaux a été effectué le 21ème jour. Une administration quotidienne de 2,5 mg de progestérone a permis la poursuite normale de la gestation.
- Chez les rattes cycliques ou pseudogestantes, nous avons prélevé le sang périphérique au niveau de l'aorte abdominale

ainsi que le sang de la veine efférente de l'ovaire. Chez les rattes gestantes, nous avons prélevé, outre le sang périphérique, le sang d'un tronc veineux latero-utérin qui collecte les veinules de provenance utérine, le sang embryonnaire ainsi que le liquide amniotique. Avant leur sacrifice, les animaux ont reçu une injection d'héparine et le sang a été recueilli également sur héparine.

b) Une dizaine de cobayes femelles pesant de 400 à 800 g ont été sacrifiées à différents stades de la gestation. Nous avons effectué sur ces bêtes les mêmes prélèvements que sur les rattes.

L'avancement de la gestation a été défini d'après les caractéristiques morphologiques et d'après la vitalité des foetus au moment du sacrifice : taille, poids, coloration et longueur du poil, yeux ouverts ou fermés, mobilité ou immobilité.

c) Une guenon cercopithecus de 7 kg a reçu des gonadotrophines chorioniques à raison de 8 injections de 500 U.I. à intervalles de 5 jours. La 1ère injection a eu lieu 2 jours avant l'ovulation présumée; la courbe de température ainsi que les frottis vaginaux ont été contrôlés régulièrement. Le sang périphérique a été prélevé tous les 5 jours pour le dosage des stéroïdes hormonaux.

d) Méthodes

Les estrogènes ont été mesurés par la technique de radio-immunodosage décrite plus haut. Dans quelques cas de rattes en fin de gestation, nous avons évalué les estrogènes après solvolyse et après hydrolyse par la β-glucuronidase afin de comparer les fractions sulfate et glucuronide des estrogènes à la fraction libre. Dans tous les cas, les estrogènes ont été déterminés sur des volumes de 1 à 2 ml de plasma provenant de 1 à 4 animaux réunis en pool. Le dosage des estrogènes chez les cobayes a, par contre, été effectué sur des volumes plus importants pouvant aller jusqu'à 5 ml.

La progestérone a été déterminée sur des volumes sanguins de 0,5 ml par la technique de liaison protéique compétitive, dérivée de celle de Johansson.

II) - ANALYSE DES STEROIDES HORMONAUX CHEZ LA RATTE

1) Résultats obtenus au cours du cycle

La plupart des déterminations ont été faites à la fin du proestrus et une seule fois pendant le diestrus. Les taux moyens d'estrone, d'estradiol et de progestérone que nous avons obtenus dans le sang des veines périphérique et ovarienne, sont indiqués dans le tableau XLVV. Le nombre de pools étudiés dans chaque cas ainsi que les valeurs extrêmes obtenues sont également notées dans ce tableau.

Nous avons trouvé des taux appréciables de progestérone dans tous les pools de sang prélevés au moment du proestrus, à l'exception d'un seul.Les quantités de progestérone trouvées pendant le diestrus sont du même ordre de grandeur. Par contre, il y a une différence importante entre le sang de la veine périphérique et le sang de la veine ovarienne, la progestérone étant environ 3 fois plus élevée dans ce dernier.

Les taux de l'estrone et de l'estradiol indiquent une prédominance du premier stéroïde phénolique sur le second. Nous avons été surpris de constater des taux sensiblement analogues d'estrogènes dans le sang des deux veines. Le rapport E_2/E_1 est variable, oscillant de 0,57 à 1,25 aussi bien dans le plasma périphérique que dans le plasma de la veine ovarienne.

2) Corps jaune pseudo-gestatif de la ratte

L'injection quotidienne de 100 U.I. de gonadotrophine chorionique a provoqué la persistance de corps jaunes que l'on a pu observer à la laparotomie. Ces corps jaunes étaient parfois accompagnés de follicules hémorragiques.

Les taux d'estrogènes et de progestérone mesurés dans le plasma des veines ovarienne et périphérique après administration de HCG sont comparés aux taux obtenus pendant le cycle normal (tableau XLV). Alors que dans le sang périphérique, il n'y a pas de modification du taux des estrogènes, on peut noter une

TABLEAU XLV

TAUX DES ESTROGENES ET DE LA PROGESTERONE PLASMATIQUES AU COURS DU CYCLE ET AU COURS DE LA PSEUDOGESTATION CHEZ LA RATTE

	PLASMA PERIPHERIQUE			PLASMA OVARIEN		
	E_1	E_2	P	E_1	E_2	P
Proestrus	122 (83-168)n=7	3 x traces et 100 (65-146)n=4	1x 4,1 et 17,5 (9,5-23,7)n=4	190 (125-270)n=6	4 x traces et 205 (102-308)n=2	1 x 15,9 et 45 (26-69)n=5
Diestrus	232	123	24,6	170	89	72
Pseudo-gestation	155 (98-285)n=4	106,4 (50-182)n=4	128,4 (99-147)n=4	386 (220-620)n=4	202,3 (105-372)n=4	222,9 (161-445)n=4

E_1 = Estrone; E_2 = Estradiol; P = Progestérone

augmentation non négligeable de l'estrone et de l'estradiol dans le plasma de la veine efférente de l'ovaire.

En ce qui concerne la progestérone, l'augmentation de l'activité lutéale est très sensible puisque les taux de progestérone sont augmentés de 5 fois aussi bien dans le plasma périphérique que dans le plasma ovarien.

3) Production d'estrogènes et de progestérone chez la ratte gestante

a) Sang périphérique

Les taux de progestérone sont sensiblement identiques dans les différents pools de plasma provenant de rattes à des périodes variées de la gestation. Les valeurs oscillent entre 35 et 70 ng/ml.

Les taux d'estrone sont faibles dans les premiers jours de la gestation ($\leq$ 150 pg/ml) et ils se rélèvent significativement à partir du 14ème ou 15ème jour. Ils demeurent ensuite en plateau variant entre 150 et 400 pg/ml. L'augmentation que l'on constate pour l'estrone ne se répercute pas sur l'estradiol. Les taux de ce stéroïde phénolique, qui vont de 40 à 300 pg/ml, ne sont en effet pas significativement différents avant le 7ème jour de gestation ou à des périodes plus tardives. Pour l'estrone comme pour l'estradiol, on a pu noter une dispersion assez grande des résultats obtenus d'un pool d'animaux à l'autre.

Nous n'indiquons dans le tableau XLVI que les taux des trois stéroïdes obtenus aux 19ème et 20ème jours de la gestation. Les valeurs obtenues à des dates moins avancées de la gestation sont inclues dans les mêmes valeurs limites.

b) Plasma prélevé dans la veine latero-utérine

Les taux de progestérone déterminés dans le plasma de cette veine sont 3 à 6 fois plus élevés que dans le plasma périphérique mais là non plus, on n'a pas pu constater de modifications significatives au cours de la gestation.

Si, dans cette veine, le plasma contient 1,5 à 2,5 fois plus d'estrone, l'augmentation de l'estradiol par rapport à la veine périphérique est plus prononcée puisque ce stéroïde est 2 à 4 fois

TABLEAU XLVI

TAUX DES HORMONES STEROIDES CHEZ DES RATTES GESTANTES DE 19 A 20 JOURS

	E_1 (pg/ml)	E_2 (pg/ml)	P (ng/ml)
Sang périphérique	187 ± 105,6 n = 13	99 ± 40 n = 9	46,5 ± 20,2 n = 7
Sang de la veine latero-utérine	351,4 ± 172,4 n = 9	291 ± 186 n = 9	183 ± 136 n = 5
Liquide amniotique	1000 ± 279 n = 8	188 ± 142 n = 8	15,2(10,8-23,8) n = 3
Sang foetal	2697 ± 1045 n = 10	322 ± 161 n = 9	23,1 ± 7,3 n = 5

E_1 = Estrone; E_2 = Estradiol; P = Progestérone

plus élevé en moyenne (180 à 375 pg/ml). L'âge de la gestation n'est cependant pas reflété dans les taux d'estrogènes de cette veine.

c) Liquide amniotique

Les valeurs de la progestérone trouvées dans le liquide amniotique sont nettement plus faibles que celles trouvées dans le plasma périphérique. Elles oscillent non significativement entre 10 et 40 ng/ml.

Les concentrations de l'estradiol dans le liquide amniotique sont à peine supérieures à celles du sang périphérique (50 à 500 pg/ml). Par contre, l'estrone se trouve à des concentrations considérablement plus élevées dans ce liquide. En effet, les concentrations trouvées à la fin de la gestation atteignent 1.300 pg. On peut noter une évolution depuis les 11-12ème jours (300 pg/ml) jusqu'aux 15/16ème jours. Après cette date, les valeurs de l'estrone oscillent entre 800 et 1.300 pg/ml.

d) Sang embryonnaire

Le sang des foetus n'a pu être collecté en quantité appréciable qu'à partir du 17ème jour de la gestation, l'irrigation sanguine étant très faible avant cette date.

Les taux de progestérone, bien que toujours appréciables sont aussi faibles dans le plasma foetal que dans le liquide amniotique (de 11 à 30 ng/ml). On a pu mesurer ce stéroïde dans le sang des foetus respectivement 4 et 8 heures après la parturition. Entre ces deux dernières périodes, le taux de la progestérone avait chuté de 21 à 3 ng/ml.

Chez le foetus, l'estradiol plasmatique se trouve à des concentrations analogues à celles constatées dans le plasma de la veine latero-utérine (de 130 à 750 pg/ml). Chez le foetus, l'estrone se distingue par des taux particulièrement élevés, pouvant atteindre 5.000 pg. Le rapport E_2/E_1 est ici considérablement affaibli (de 0,05 à 0,2).

Après la mise bas, les taux d'estrone ne diminuent que lentement puisque 4 heures après la parturition on trouve encore 2.800 pg/ml et 8 heures plus tard, 1.600 pg/ml.

Les moyennes obtenues aux 19ème et 20ème jours de gestation pour l'estrone, l'estradiol et l'estriol sont rassemblées dans le tableau XLVI.

e) Estrogènes conjugués chez la ratte gestante

Sur un pool de 4 rattes gestantes de 17 à 18 jours, nous avons déterminé les taux d'estrone, d'estradiol et d'estriol, après avoir séparé les fractions sulfate et glycuronide, dans chaque prélèvement sanguin. Nous n'avons trouvé que des traces non dosables de conjugués d'estrogènes dans le sang périphérique, ainsi que dans le sang de la veine latero-utérine.

Le liquide amniotique ne contient que du sulfate d'estrone à raison de 290 pg/ml.

Le sang foetal, enfin, contient du sulfate d'estrone surtout (500 pg/ml) mais également du sulfate d'estradiol (150 pg/ml) et d'estriol (295 pg/ml). On a également pu retrouver de faibles quantités de glucuronide d'estrone et d'estriol (environ 100 pg/ml) alors qu'il n'y en avait pas dans les autres prélèvements sanguins.

f) Estrogènes et progestérone chez des rattes gestantes castrées

Des rattes ont été castrées aux 18ème, 19ème et 20ème jours de gestation respectivement; elles ont ensuite été sacrifiées le 21ème jour, soit 1, 2 et 3 jours après l'ovariectomie. Les différents prélèvements ont été effectués.

Les taux de la progestérone plasmatique se sont révélés très forts et très dispersés dans chaque liquide étudié, ce phénomène étant dû, selon toute probabilité à l'administration quotidienne de progestérone réalisée chez ces rattes à partir du jour de l'ovariectomie.

TABLEAU XLVII

Taux des stéroides sanguins en fin de gestation après ou sans ovariectomie

		Gestation normale (n=16 à 30)	Après castration 1 jour (n=3)	2 jours (n=4)	3 jours (n=3)
Sang périphérique	E_1	177 ± 88,8	205-210	120-130	155-205
	E_2	120 ± 75	140	40-126	65-205
	P	48,4 ± 14,0	70-420	70-165	70
Sang utérin	E_1	290 ± 145	245-275	145-300	145-200
	E_2	262 ± 139	100-220	95-110	60-165
	P	175,5±114	44-110	128-176	58
Liquide amniotique	E_1	950 ± 284	730-880	365-635	505-1045
	E_2	172 ± 120	-	75-305	200-665
	P	19,2 ± 12,3	107	134,5	-
Sang foetal	E_1	2563 ± 895	800-2035	540-935	2520-3185
	E_2	334,6 ± 190	385-496	75-305	500-665
	P	19,8 ± 7,3	70-217	55-217	62

n = nombre de pools analysés

Les taux de l'estrone et de l'estradiol obtenus pour chaque chaque type de prélèvement sont indiqués dans le tableau XLVII.

On peut constater une diminution du taux des estrogènes et notamment dans le sang de la veine latero-utérine. Il semble que dans le sang foetal, cette chute ne soit que temporaire; en effet après 3 jours, les taux d'estrone comme ceux de l'estradiol ont repris leur valeur normale.

4) Discussion

Nous séparerons cette discussion en deux parties, l'une concernant la progestérone et l'autre, les estrogènes, comparant nos résultats à ceux des autres auteurset nous interrogeant à l'aide de l'ensemble de ces données sur l'origine des progestagènes et des gestagènes chez la ratte.

a) Progestérone

Nous avons été surpris de trouver des quantités relativement importantes de progestérone dans le sang périphérique de la ratte au moment du proestrus. Plusieurs auteurs ont cependant pu mettre en évidence une sécrétion de progestérone avant l'ovulation, c'est-à-dire en l'absence d'une structure lutéale chez cet animal (ETO et col. 1962; HASHIMOTO et col. 1968; FEDER et col. 1968). Il y aurait donc dans les follicules de la ratte des cellules capables de sécréter de la progestérone . Nous pouvons difficilement comparer les taux que nous obtenons dans le sang périphérique à ceux donnés par les autres auteurs, ceux-ci ayant analysé le sang ovarien uniquement. Pour ce dernier, HASHIMOTO et ses collaborateurs (1968) indiquent des taux de l'ordre de 100 à 1.100 ng/ml le jour du proestrus et de 210 à 480 ng/ ml le jour du diestrus. Si les taux que nous trouvons dans le sang de la veine ovarienne sont nettement plus élevés (3 fois en moyenne) que ceux de la veine périphérique, ils sont loin cependant d'atteindre les valeurs données par cet auteur. D'autres auteurs ont mesuré les taux de sécrétion de la progestérone pendant le diestrus (BARRACLOUGH et col. 1971; ROSER et BLOCH, 1969). Les taux par ovaire et par heure sont très variables d'un auteur à l'autre.

Après administration de gonadotrophines chorioniques, nous avons pu constater, à la laparotomie, la présence de plusieurs corps jaunes et en même temps une production de progestérone nettement amplifiée (5 fois au moins).

Au cours de la gestation, les taux de progestérone trouvés dans le sang périphérique sont nettement supérieurs à ceux obtenus pendant le cycle de la ratte puisque nous n'avons à aucun moment de la gestation, trouvé de taux inférieurs à 25 ng/ml. Cependant, quel que soit l'âge de la gestation, la progestérone n'atteint pas les valeurs obtenues après stimulation lutéale par HCG. Il peut être intéressant de rappeler ici les observations que nous avons pu faire chez la femme chez laquelle la production de progestérone par le corps jaune gestatif est constamment inférieure à celle du corps jaune pseudo-gestatif.

L'absence de modifications de la progestéronémie, que nous avons observée au cours de la gestation de la ratte, est en désaccord avec les constatations faites par plusieurs auteurs et notamment par HASHIMOTO (1968) pour lequel les taux de la veine ovarienne passent de 490 ng/ml au jour 1 de la gestation à un maximum de 3950 ng/ml au jour 14 puis à des valeurs plus faibles en fin de gestation. LECLERCQ et al. (1971) donnent des taux dans le sang périphérique de 56 ng/ml au jour 11, de 108 aux jours 15 et 16 et de 35 ng/ml pendant les deux derniers jours. Citons encore MORISHIGE et ses collaborateurs (1973) qui par une technique de radiocompétition ont déterminé une augmentation depuis des taux inférieurs à 100 ng/ml les 12 premiers jours jusqu'à des taux de 100 à 150 ng/ml du 13ème au 19ème jour de la gestation.

Les résultats que nous avons obtenus aussi bien dans le plasma périphérique que dans celui de la veine latero-utérine ou que dans le plasma foetal ne confirment pas cette production accrue de progestérone au milieu de la gestation.

Les concentrations de la progestérone dans le plasma foetal et dans le liquide amniotique, bien qu'appréciables sont très

inférieures à celles du plasma périphérique et surtout à celles obtenues dans le plasma de la veine latero-utérine (fig. 35). Chez les foetus, la progestérone disparait très rapidement après la mise bas.

Après castration enfin, les taux de la progestérone sont très élevés mais sont sans doute contaminés par la progestérone d'origine exogène. On peut cependant souligner que les taux obtenus dans le sang foetal sont identiques à ceux obtenus dans le sang périphérique alors que nous avons vu qu'au cours de la gestation normale ils étaient en moyenne deux fois inférieurs.

b) Estrogènes

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus pour les estrogènes produits chez les rattes a permis de constater une très grande dispersion des taux d'estrone et d'estradiol d'un pool d'animaux à l'autre. Le rapport E_2/E_1 était également très variable suivant les pools; l'estrone cependant est en général l'estrogène prépondérant.

Nous n'avons pas trouvé d'estriol sous forme libre chez aucun animal. De faibles quantités d'estriol sous forme sulfate et glycuronide ont pu être mesurées dans le sang de foetus seulement. Les conjugués d'estrogène ne représentent qu'une partie mineure des estrogènes totaux chez la ratte. Seul le sang foetal contient du sulfate d'estrone en quantités non négligeables (de l'ordre de 500 pg/ml) mais bien inférieures à celles de la fraction libre.

Nous avons trouvé des quantités appréciables d'estrone dans le sang périphérique de la ratte au cours du cycle, les valeurs n'étant pas significativement différentes entre le proestrus et le diestrus. Par ailleurs, les valeurs obtenues dans le plasma ovarien ne sont pas significativement supérieures. L'estradiol se trouve souvent à l'état de traces seulement malgré des taux parfois appréciables chez certains animaux. Le rapport E_2/E_1 du plasma périphérique est donc tout à fait différent de celui que nous avons trouvé pendant le cycle menstruel de la femme.

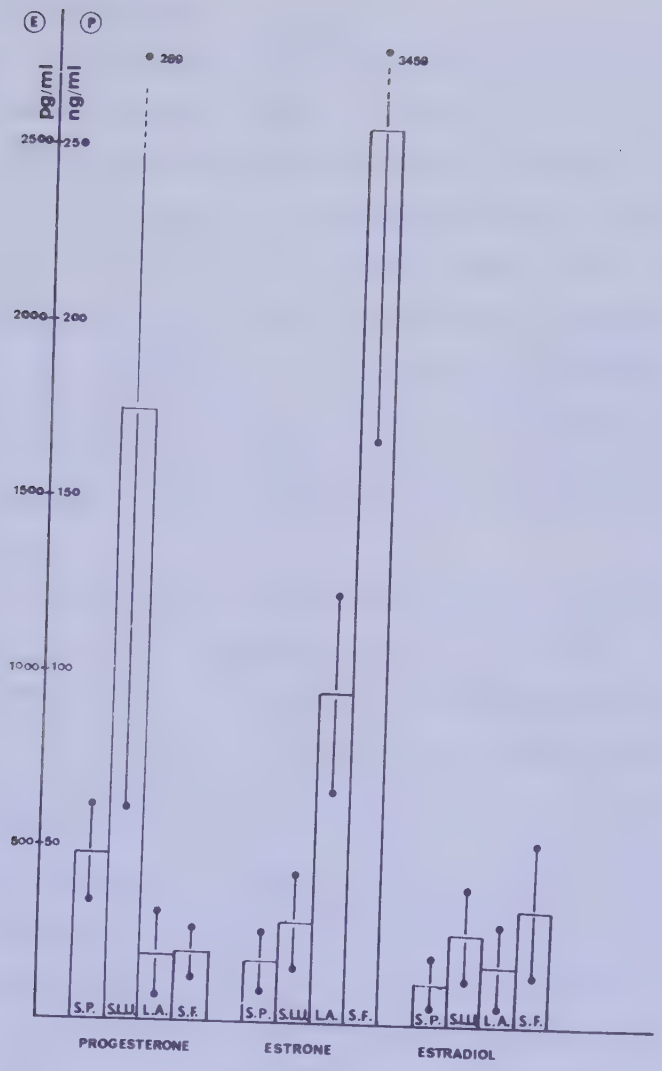


Fig.35 Répartition de l'estrone, de l'estradiol et de la progesterone dans les différents fluides biologiques de la ratte au cours de la gestation (SP = sang périphérique; S.L.U.= sang de la veine latéro-utérine; L.A.= liquide amniotique; S.F.= sang foetal; E = estrogènes; P = progesterone)

La littérature ne possède que peu de données sur les concentrations en estrogènes du plasma périphérique chez les rattes non gravides. PRESL en 1967 a trouvé par la technique fluorométrique des concentrations considérables pouvant aller jusqu'à 20.000 pg/ml d'estrogènes totaux. EXLEY, par contre, avec BROWN GRANT (EXLEY, 1969; BROWN GRANT et al. 1970) a pu déterminer par une méthode extrêmement sensible de radiocompétition (l'agent de liaison étant une protéine présente dans l'utérus de lapine) des valeurs très faibles d'estradiol dans les différentes phases du cycle; ces valeurs vont de 3 à 30 pg/ml, le taux maximum étant trouvé le matin du proestrus. Ces auteurs n'ont pas analysé l'estrone.

Par contre, des concentrations ou des taux de sécrétion de l'estrone et de l'estradiol ont été indiqués par plusieurs auteurs pour le sang veineux ovarien. YOSHINAGA notamment (1969) obtient des valeurs maximums en équivalent d'estradiol, allant jusqu'à 4.500 pg/ml au proestrus et au diestrus. Cet auteur utilise une méthode biologique. SHAIKH (1971), par radioimmunodosage a déterminé des taux minimums d'estrone de 26 pg/ml en estrus et maximums de 415 pg/ml en proestrus; les valeurs minimum et maximum de l'estradiol, situées aux mêmes périodes étaient respectivement de 160 et 2.200 pg/ml. Ces valeurs ne correspondent pas tout à fait à celles que nous avons obtenues et qui, en diestrus, notamment, sont bien inférieures.

Par administration de gonadotrophines, on a une surstimulation des corps jaunes ovariens; celle-ci ne se traduit pas seulement par une forte augmentation de la progestérone mais aussi par une augmentation appréciable de l'estrone et de l'estradiol dans le sang de la veine ovarienne.

Au cours de la gestation, nous n'avons pas trouvé de modifications importantes des taux d'estrone et d'estradiol dans le sang maternel. Seule l'estrone semble subir une légère augmentation après la 1ère semaine de la gestation. Plusieurs auteurs ont constaté cependant une augmentation appréciable des taux de

sécrétion de l'estrone ou de l'estradiol dans le sang de la veine ovarienne au 4ème jour de la gestation (YOSHINAGA et al. 1969; NIMROD et al. 1971; WAYNFORTH et al. 1972). SHAIKH par contre (1971) n'a constaté une augmentation sensible des taux d'estrone et d'estradiol dans le plasma ovarien que pendant les deux derniers jours de la gestation.

Après ovariectomie chez des rattes en fin de gestation, la diminution des estrogènes est sensible mais alors qu'elle est d'autant plus importante dans le sang périphérique ou utérin que l'ovariectomie est effectuée plus tôt, chez le foetus au contraire cette diminution n'est que passagère.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données concernant les concentrations de stéroïdes chez les rats embryonnaires. La notion d'une différence considérable dans la composition hormonale du sang maternel et du sang foetal est donc tout à fait neuve. L'estrone mesurée dans le sang foetal est 10 à 20 fois plus importante que celle mesurée chez la mère. Le rapport E_2/E_1 qui est de 0,8 chez la mère n'est plus que de 0,1 environ dans le plasma embryonnaire. La figure 35 permet de se représenter plus facilement cette répartition inégale des stéroïdes dans les divers compartiments biologiques. Il est intéressant de noter que dans le liquide amniotique, les valeurs de l'estrone sont intermédiaires entre les taux des plasmas périphérique et foetal.

Cette prépondérance considérable de l'estrone dans le sang foetal peut être reliée à la présence démontrée récemment (NUNEZ et al. 1971) d'une protéine à forte affinité pour l'estrone et pour l'estradiol chez le rat embryonnaire. Cette α-foeto-protéine a une affinité légèrement supérieure pour l'estrone par rapport à l'estradiol. Elle n'en a aucune par contre pour l'estriol (NUNEZ et al. 1971; SAVU et al. 1972). L'estrone et l'estradiol seraient donc piégés par cette protéine spécifique dès leur production par le placenta. Ceci explique la concentration beaucoup plus élevée dans le sang foetal et le liquide amniotique.

On ne connait pas actuellement la signification physiologique des estrogènes élaborés et fixés dans le compartiment foetal. On ne sait pas si l'α-foeto-protéine qui fixe l'estrone et l'estradiol permet le transport de ces estrogènes dans les différents tissus. Tout ce qu'il est permis de dire dans l'état actuel de nos connaissances, c'est que le foetus de plusieurs espèces se protège, par des mécanismes différents, de l'activité biologique de l'estradiol. Le foetus humain convertit l'estrone et l'estradiol en sulfate d'estriol qui prédomine dans le compartiment foetal. Le foetus de rat transforme l'estradiol en estrone et fixe ces deux estrogènes sur une protéine qui contribue à leur inactivation.

Conclusion

Après cette confrontation de nos propres résultats et de ceux de la littérature, quelles sont les données que nous pouvons mettre en évidence ?

Tout d'abord, le placenta est-il une source de progestérone ? Dans le sang foetal, on trouve en général un taux de progestérone qui est de 50 % inférieur à celui du plasma périphérique de la mère. De même le liquide amniotique ne possède que des taux très faibles de progestérone. Après castration et traitement quotidien par 2,5 mg de progestérone, les taux de progestérone dans le sang embryonnaire sont plus élevés et sensiblement identiques dans le compartiment foetal et dans le compartiment maternel. Cela montre que la progestérone libre passe très facilement d'un compartiment dans l'autre; il est probable qu'après administration de progestérone, la fraction libre plasmatique s'élève par rapport à la fraction fixée par les protéines de liaison, ce qui expliquerait l'égalité entre les valeurs trouvées dans les plasmas foetal et périphérique. Ces données sont en faveur de l'absence de sécrétion de progestérone par le placenta.

Peut-on alors attribuer la sécrétion de progestérone à l'ovaire ? Nous avons mesuré des quantités importantes de progestérone chez la ratte non gravide dans le sang périphérique mais les quantités trouvées dans le sang ovarien étaient encore beaucoup plus importantes. D'autre part, l'action des gonadotrophines chorioniques s'est manifestée par une activité lutéale très accrue puisque les taux de la progestérone étaient 5 fois plus importants. Enfin les concentrations de la progestérone sont supérieures dans le sang maternel (périphérique et surtout latero-utérin) par rapport à celles du sang embryonnaire. A partir de tous ces éléments, il semble évident que l'ovaire soit une source importante de progestérone. Au cours de la gestation, compte tenu des faibles teneurs du sang foetal et du liquide amniotique, il est vraisemblable que le placenta n'est pas un producteur appréciable de progestérone. L'ovaire serait responsable en grande partie sinon en totalité de cette production hormonale.

Les mêmes questions peuvent être posées à propos des estrogènes : le placenta est-il une source d'estrogènes ? La forte concentration d'estrone retrouvée dans le sang foetal permet de répondre par l'affirmative avec une bonne certitude. Les résultats trouvés pour le sang foetal, de 1 à 3 jours après l'ovariectomie, c'est-à-dire une chute au début de la castration puis une remontée aux valeurs initiales dès le 3ème jour, sont en faveur d'une origine placentaire pour une partie au moins des estrogènes au cours de la gestation.

L'ovaire a-t-il également un rôle dans cette sécrétion d'estrogène chez la ratte ? Trois arguments militent en faveur de cette production : le premier est fourni par les valeurs très élevées d'estrogènes mesurées par YOSHINAGA (1969), NIMROD (1971) et WAYNFORTH (1972) dans la veine ovarienne et leur augmentation au cours de la gestation. Nous retrouvons cette augmentation dans le sang de la veine latero-utérine. Néanmoins les taux que nous avons constatés aux différentes périodes de la grossesse sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés chez les animaux non

gravides aux différentes périodes du cycle. Comme il n'y a pas chez la ratte adulte de protéines liant les estrogènes comme dans l'espèce humaine, on conçoit que les estrogènes qui sont à l'état libre subissent un métabolisme hépatique plus rapide et de ce fait les estrogènes périphériques ne sont pas le reflet de la production des estrogènes par l'ovaire ou le placenta.

Un deuxième argument est donné par l'augmentation de l'estrone comme de l'estradiol, que nous avons constatée dans la veine ovarienne après administration de gonadotrophine chorionique.

L'ensemble de ces données nous permet de conclure qu'au cours de la gestation, une grande partie des estrogènes est synthétisée dans le placenta sans qu'on puisse retirer l'hypothèse d'une sécrétion ovarienne tout au long de la gestation.

III) - STEROIDES HORMONAUX CHEZ LE COBAYE AU COURS DE LA GESTATION

Nous avons analysé l'estrone, l'estradiol et la progestérone dans le plasma de 10 cobayes femelles se trouvant à divers stades de la gestation. Nous avons pu définir 3 périodes dans la gestation de ces animaux d'après les caractéristiques morphologiques et de vitalité des embryons. Les prélèvements biologiques effectués sont les mêmes que ceux réalisés chez la ratte.

Résultats -

Le tableau XLVIII rassemble les résultats obtenus pour les 3 groupes d'animaux.

La progestérone circulante se trouve chez le cobaye à des taux appréciables tout au long de la gestation mais les taux ne se modifient pas de manière significative avec l'âge de la gestation;

TABLEAU XLVIII

TAUX DES ESTROGENES ET DE LA PROGESTERONE CHEZ LA COBAYE GESTANTE

(moyenne, valeurs extrêmes et nombre de bêtes étudiées)

Avancement de la gestation		P = ng/ml	E_1 pg/ml	E_2 pg/ml
1er mois	L < 5 cm P < 20g poils ⊖	P.per. 53,6 n=1	80 n = 2 (70-90)	75 n = 2 (55-95)
		P.L.U 30,3	87 (80-95)	75 (55-100)
		L.A. 6,3	traces	traces
		P.F. 15,8	140	traces
2ème mois	8 < L < 10cm 25 < P < 50g Poils courts Vitalité +	P.per. 37 n=2 (32-43)	165 n = 2 (110-255)	237 n = 5 (100-480)
		P. LU 45,5 n=2 (42,2-48,7)	115 n = 5 (70-180)	164 n = 6 (110-305)
		L.A. 13,5 n=4 (4,8-29,2)	39,2 n=5 (16-65)	41,3 n = 4 (30-64)
		P.F. 23,6 n=3 12,7-36,2	134 n = 5 (60-265)	140 n = 4 (35-255)
Dernière Semaine	10 < L < 11cm 50 < P < 65 Poils longs Vitalité +++	P.per. 33,7 n=1	55 n = 1	70 n = 1
		P.LU. 37,6 n = 1	90 n = 2	95 n = 2
		L.A. 7,9 n = 1	traces n = 2	traces n = 2
		P.F. 18 n = 1	160 n = 2 (150-170)	traces n = 2

L = longueur du foetus

P = poids du foetus

L.A. = liquide amniotique

P.per. = plasma périphérique

P.L.U. = Plasma de la veine latero-utérine

P.F. = plasma du foetus

ils oscillent entre 32 et 54 ng/ml. Contrairement à ce que nous avons trouvé chez la ratte, la concentration en progestérone n'est pas supérieure dans le sang de la veine latero-utérine (30 à 49 ng/ml). Par ailleurs, bien que les taux soient mesurables, la concentration en progestérone dans le sang foetal et dans le liquide amniotique est bien inférieure à celle du sang périphérique.

Les taux d'estrogènes sont très faibles dans tous les prélèvements sanguins ou amniotique effectués chez les cobayes gestantes. On peut cependant noter une élévation significative des taux d'estrone et d'estradiol dans chaque catégorie de plasma étudié ainsi que dans le liquide amniotique après le premier mois de la gestation; les différents taux reprennent leur valeur initiale au cours de la dernière semaine de gestation. Dans l'ensemble, les taux d'estrogènes les plus faibles sont ceux obtenus dans le liquide amniotique, alors que les concentrations sont identiques dans le sang maternel et dans le sang foetal.

Le rapport E_2/E_1 est sensiblement le même dans les différentes fractions et en moyenne est voisin de l'unité.

Discussion

CHALLIS, HEAP et ILLINGWORTH ont présenté dans plusieurs publications les travaux qu'ils ont effectués sur le cobaye (ILLINGWORTH et DEANESLY, 1972 - CHALLIS et al. 1971 - HEAP et al. 1973). Ces auteurs ont étudié particulièrement le métabolisme de la progestérone chez ces animaux, mais ils ont également étudié mesuré la totalité des estrogènes libres en équivalent d'estradiol par ml de plasma périphérique au cours de la gestation.

CHALLIS (1971) constate une augmentation nette de la progestérone dès la fin du 1er mois de gestation, les taux passant de valeurs comprises entre 18 et 70 ng/ml à des valeurs supérieures à 200 ng/ml. Nous ne retrouvons pas cette augmentation chez les cobayes gestantes de plus d'un mois, alors que nos valeurs en début de gestation sont analogues à celles données par CHALLIS.

En ce qui concerne les estrogènes, ce même auteur constate une augmentation progressive des taux au cours de la gestation. Cependant les taux sont bien inférieurs aux nôtres; les valeurs maximums au 60ème jour de gestation ne dépassent pas 30 pg/ml. CHALLIS effectue le dosage des estrogènes par radioimmunodosage sur des volumes de 1 ml de sérum. Il est donc amené à mesurer des quantités d'estrogènes inférieures à 10 pg. Nous avons préféré utiliser de plus grands volumes de sérum (5 ml); la spécificité de notre technique est assurée d'une part, par la haute spécificité de notre immunsérum antiestradiol, d'autre part, par le passage des extraits organiques sur une colonne chromatographique de sephadex LH 20 qui nous a permis de doser séparément l'estrone et l'estradiol.

Que conclure de l'ensemble des données que nous possèdons sur le cobaye ?

DEANESLY (1960) a constaté qu'une sécrétion de progestérone et d'estrogènes était nécessaire pour la mucification de l'épithélium vaginal. Par ailleurs, les recherches effectuées par les différents auteurs cités qui ont dosé la progestérone et les estrogènes après la castration de cobayes gravides, ont établi que l'ovaire et le placenta contribuaient à la production d'estrogènes et de progestérone chez ces animaux. Nos propres résultats ne montrent pas d'augmentation des taux de la progestérone au cours de la gestation. D'après CHALLIS et al (1971), pour extraire la totalité de la progestérone, il est nécessaire d'alcaliniser le plasma afin de rompre la liaison existant entre la progestérone et une protéine de haute affinité pour ce stéroïde (PBP). Peut-être est-ce la raison pour laquelle nous trouvons des valeurs inférieures de progestérone.

Par ailleurs, nous voyons à partir de nos résultats que dès l'extrême début de la gestation (embryons de 4 mm), à une époque où le placenta ne synthétise vraisembl blement pas d'hormones stéroïdes, nous avons trouvé des quantités mesurables d'estrone et d'estradiol. En dehors de la grossesse, les quantités d'estrogènes circulants ne sont pas détectables par notre technique

de radioimmunodosage. L'augmentation trouvée au 2ème mois de la gestation est sans doute à mettre sur le compte du placenta. Les quantités d'estrogènes que nous détectons sont très supérieures à celles mesurées par CHALLIS et al. (1971). Le rapport E_2/E_1, bien qu'assez variable, est en général voisin de l'unité. Au cours de la gestation, il peut même atteindre 2; ce rapport est donc très différent de celui trouvé chez la ratte.

Dans le sang foetal, si les valeurs d'estrone sont analogues à celles trouvées chez la mère, on ne trouve d'estradiol que dans la 2ème partie de la grossesse. Comme il n'existe pas chez le cobaye embryonnaire de protéine fixant les estrogènes comme l'α-foeto-protéine de rat (NUNEZ et al., communication personnelle), cela explique que les taux dans le compartiment foetal ne soient pas supérieurs à ceux du sang maternel.

d) Corps jaune pseudogestatif chez le Cercopithèque

A titre indicatif, nous donnons les résultats préliminaires obtenus chez un singe cercopithecus qui a reçu 3.000 U.I. (en 8 x 500 U.I. à intervalles de 5 jours) de gonadotrophine chorionique à partir du jour de l'ovulation. Des prélèvements de sang périphérique ont été effectués tous les 5 jours pendant la durée du corps jaune pseudogestatif.

Les résultats ainsi que le protocole de l'épreuve sont indiqués sur la figure 36. Nous n'avons détecté d'estriol dans aucun des prélèvements.

La seule conclusion que l'on puisse tirer de ces résultats est la quantité appréciable des estrogènes obtenus par transformation du corps jaune cyclique en corps jaune pseudogestatif.

En revanche, les quantités de progestérone qui sont mesurables au début du traitement disparaissent par la suite.

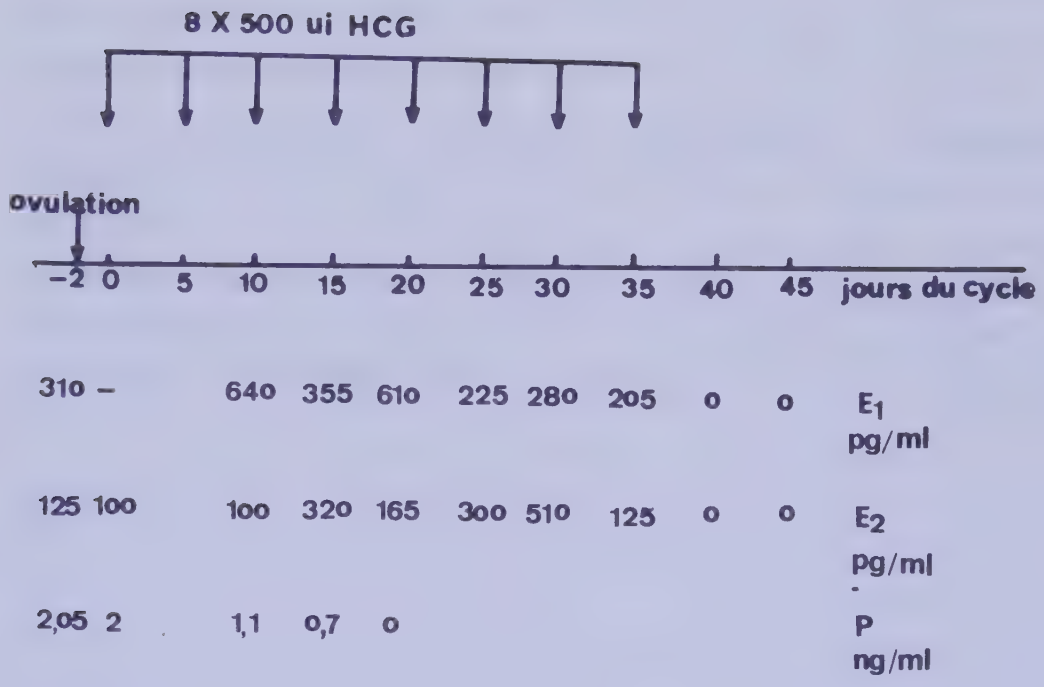


Figure 36 - Protocole d'induction d'un corps jaune pseudogestatif par HCG chez la guenon cercopithèque et taux des estrogènes et de la progestérone au cours de la pseudogestation.
(E_1 = estrone; E_2 = estradiol; P = Progestérone)

Les résultats que nous avons obtenus chez la ratte et chez le cobaye, confrontés à ceux des autres auteurs, nous permettent de conclure :

- à une origine essentiellement ovarienne de la progestérone chez la ratte gestante. Chez le cobaye au contraire ce progestagène proviendrait à la fois de l'ovaire et du placenta.

- à une production d'estrogènes par l'ovaire mais surtout par le placenta de la ratte gravide. Chez le cobaye, cette sécrétion serait assurée également par l'ovaire et par le placenta.

- à la présence de quantités considérables d'estrogènes et notamment d'estrone chez l'embryon de rat. La présence d'une protéine de très haute affinité pour les estrogènes explique ce phénomène. L'absence de cette même protéine chez le cobaye embryonnaire est traduite au contraire par des concentrations analogues d'estrogènes chez la mère et le foetus de cette espèce.

RESUME

Dans ce travail, nous nous proposions d'aborder l'étude des fonctions ovarienne et placentaire chez différents mammifères en orientant nos recherches sur les enseignements apportés par des analyses précises et diversifiées des estrogènes et de la progestérone dans différents fluides biologiques.

Cette étude approfondie des stéroïdes libres et conjugués impliquait de disposer de techniques d'analyse particulièrement sensibles et spécifiques. Les trois parties de cette thèse concernent donc la mise au point et l'analyse critique de telles méthodes ainsi que les éléments d'ordre physiologique obtenus grâce à celles-ci.

Dans la première partie, nous avons étudié les réactions colorées et la fluorescence d'un grand nombre d'estrogènes et de leurs dérivés en présence de différents acides. Nous avons ainsi pu noter pour la plupart de ces stéroïdes phénoliques un comportement caractéristique dans l'une ou l'autre des modalités décrites, offrant un critère supplémentaire d'identification pour chacun. D'un point de vue quantitatif, si la fluorométrie a permis de déterminer la totalité de chaque estrogène libre et conjugué dans le sérum de la femme, elle n'est pas assez sensible pour l'évaluation de la fonction libre de chacun des trois estrogènes principaux, dont la concentration est très faible.

L'analyse des stéroïdes hormonaux par radioimmunocompétition a permis d'envisager ces explorations fonctionnelles sous une nouvelle dimension, de par la sensibilité et la spécificité de cette méthode.

La deuxième partie de ce travail concerne donc la préparation d'antigènes stéroïdiques, l'obtention d'immunsérums et l'analyse de ceux-ci sur les plans immunologique et physico-chimique. L'antigène stéroïdique 6-carboxy-méthyloxime-estriol-BSA a été

obtenu par synthèse organique des différents composés intermédiaires et couplage à la protéine.

A chaque étape de cette synthèse, les composés ont été vérifiés par spectres infra-rouge, de résonance magnétique nucléaire, de masse, etc. Une trentaine de molécules d'estriol ont ainsi été fixés par molécule de BSA.

Les immunsérums obtenus à partir de cet antigène ont été testés (titre, spécificité, sensibilité, affinité) en même temps que les conditions expérimentales de la réaction antigène-anticorps (température, pH, temps d'incubation, etc.)

Nous avons défini les critères de sensibilité et d'activité des immunsérums et nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude de leur affinité et de leur spécificité. En particulier, l'indice d'affinité défini par PEARLMAN et CREPY, 1/P, a été mesuré pour les immunsérums anti-estrogènes étudiés. Nous avons également déterminé les constantes d'association qui sont de l'ordre de 10^9. Une étude critique de la définition classique de la spécificité nous a amenés à proposer un nouveau test, qui, en répondant rigoureusement aux conditions nécessaires pour une étude physiologique, nous a permis de découvrir parmi le lot d'immunsérums anti-estriol préparés, un sérum de spécificité absolue.

Dans la troisième partie, nous avons réalisé la détermination des trois estrogènes libres et de la progestérone par des méthodes de radiocompétition dans des liquides biologiques humains, plasma et urine. Nous avons simultanément réalisé les dosages de l'ensemble des stéroïdes hormonaux dans les urines par des méthodes de chromatographie gazeuse et de fluorométrie. Les prélèvements ont été effectués pendant les deux phases du cycle menstruel, après stimulation pré-ovulatoire par HMG ou par le clomifène et post-ovulatoire par HCG ainsi qu'au cours de la grossesse. Dans toutes ces circonstances, nous avons étudié les

relations entre les hormones stéroïdes libres plasmatiques et urinaires d'une part et les stéroïdes hormonaux urinaires totaux d'autre part. Les faits importants que nous avons pu souligner sont les suivants :

En dehors de la grossesse, nous avons trouvé un rapport E_2/E_1 dans le plasma qui est supérieur à l'unité alors qu'il est en moyenne de 0,2 dans l'urine . Néanmoins, il existe une bonne relation entre l'estradiol libre du plasma et la somme $E_1 + E_2$ libres urinaires. La variabilité du rapport E_2/E_1 dans le plasma s'oppose à la constance relative du rapport E_2/E_1 dans l'urine. Alors que dans le plasma c'est l'estradiol qui reflète le mieux l'activité de la thèque folliculaire, dans l'urine c'est l'estrone qui est l'estrogène prédominant. L'estriol libre qui n'est pas détectable dans le plasma, se trouve à des concentrations appréciables dans les urines et subit des variations significatives au cours du cycle.

Sous l'effet de HMG, nous avons constaté dans le plasma à la fois une augmentation de l'estradiol et du rapport E_2/E_1. Nous avons été surpris de ne pas trouver une augmentation aussi importante de l'estradiol lorsque l'ovaire était stimulé en phase lutéale par HCG alors que l'augmentation des estrogènes urinaires était équivalente. Nous pensons pouvoir expliquer cette constatation paradoxale par le fait que dans la stimulation du corps jaune par HCG, c'est l'estrone libre circulante qui est principalement augmentée. Comme elle est plus rapidement métabolisée, les divergences observées sont ainsi plus compréhensibles.

Les résultats concernant la progestérone ont montré qu'en dehors de la grossesse, il y a une bonne corrélation entre le taux de la progestérone urinaire, de la progestérone plasmatique et du prégnandiol urinaire.

Au cours de la grossesse, le dosage de l'estriol libre urinaire s'est révélé aussi intéressant que celui de l'estriol conjugué ou des estrogènes totaux de l'urine pour suivre le développement

du compartiment foeto-placentaire. Le tracé de chacun des estrogènes libres del'urine et du plasma fait apparaître entre la 10ème et la 13ème semaines un accident qui est probablement à mettre sur le compte de l'activité placentaire et au-delà de la 15ème semaine, un redressement de la pente de l'estriol qui est lié au développement foetal.

Chez le rat, les données les plus importantes qui ont été constatées sont :

- un rapport E_2/E_1 plasmatique variable et le plus souvent inférieur à l'unité, contrairement à ce qui est observé chez la femme.

- une augmentation du taux des estrogènes après administration de gonadotrophines chorioniques humaines, ceci apportant la preuve d'une production d'estrogènes ,outre celle de progestérone, par le corps jaune pseudogestatif de la ratte.

- un tracé plat des estrogènes au cours de la gestation aussi bien dans le plasma périphérique que dans celui de la veine utérine, avec cependant des valeurs légèrement plus faibles pour l'estrone pendant la première semaine de gestation ($<$ 100 pg/ml).

- l'absence d'évolution des taux de la progestérone au cours de la gestation. Ce progestagène se trouve à des concentrations plus fortes dans le plasma provenant du sang de la veine utérine (60 à 330 ng/ml) que dans celui provenant du sang périphérique (35 à 70 ng) ou surtout dans le plasma foetal et le liquide amniotique.

- l'absence d'estrogènes conjugués dans le plasma périphérique alors que chez la femme, ils représentent la majeure partie des estrogènes circulants.

- la mise en évidence dans le plasma embryonnaire d'une activité faible mais mesurable de sulfo- et de glycuroconjugaison. Des traces d'estriol sous forme conjuguée ont pu être détectées. L'estrogène conjugué prédominant est cependant le sulfate d'estrone dans le sérum embryonnaire (500 pg/ml).

- des valeurs très élevées d'estrogènes libres et notamment de l'estrone dans le plasma embryonnaire; l'estrone qui peut atteindre des taux de 5 ng/ml est en effet plus de dix fois plus abondante chez le foetus que chez la mère. Ce phénomène a été relié à la présence chez le foetus d'une protéine spécifique à grande affinité pour les estrogènes, l'α-foeto-protéine.

- enfin, après ovariectomie effectuée 1 à 3 jours avant la date de la mise bas, on a constaté une diminution constante des estrogènes du sang périphérique et une diminution transitoire des estrogènes du plasma embryonnaire.

De toutes les observations accumulées, une hypothèse a pu être émise selon laquelle, si, chez le rat, l'ovaire est capable de synthétiser des estrogènes, c'est surtout le placenta ou du moins le compartiment foeto-placentaire qui serait la source principale de ces stéroïdes hormonaux. La progestérone semblerait par contre avoir une origine essentiellement ovarienne.

Les recherches moins détaillées effectuées chez le cobaye ont démontré une physiologie différente des estrogènes libres, ceux-ci étant présents à des concentrations beaucoup plus faibles que chez la ratte et ayant vraisemblablement une double origine ovarienne et placentaire.

REFERENCES

ABRAHAM G.E.
1969,J. Clin. Endocr. Metab., 29, p.866

ABRAHAM G.E., ODELL W.D., EDWARDS R., PURDY J.M.
$1970_{(1)}$ Acta Endocr. Suppl. 147

ABRAHAM G.E., ODELL W.D.
$1970_{(2)}$ in "Immunologic Methods in Steroid Determination"
Peron F.G.,Caldwell B.V.(Eds),New York, Appleton Century Crofts

ABRAHAM G.E., GROVER P.K.
$1971_{(1)}$ in "Principles of Competitive Protein Binding Assay"
Odell W.D., Daughaday W.(Eds), Lippincott, Philadelphia,p.140

ABRAHAM G.E., SWERDLOFF R., TULCHINSKY D., ODELL W.D.
$1971_{(2)}$ J. Clin. Endocr. Metab., 32, p.619

ADESSI G., GOUTTE C.,LALLIER J.C., JAYLE M.F.
$1972_{(1)}$ Clin. Chim.Acta, 40, p.399

ADESSI G., JAYLE M.F.
$1972_{(2)}$ Ann. Biol. Clin., 30,p.219

ADESSI G., EICHENBERGER D., GOUTTE C., JAYLE M.F.
1973, Clin. Chim. Acta, 43

ASCHEIM S., ZONDEK B.
1928, Med. Klin., 22, p.2023

ATTAL J., HENDELES S.M., EIK-NES K.B.
1967, Anal. Biochem., 29,394

ATTAL J.
1970, Thèse es-Sciences Naturelles, Paris VI

AXELROD L.R.
1953, J.Biol. Chem. Soc. 75, p.6301

BAIRD D.T.
1968, J. Clin. Endocr. Metab., 28,2, p.244

BAIRD D.T., GUEVARA A.
1969, J. Clin. Endocr., 29, 149

BARRACLOUGH C.A., COLLU R., MASSA R., MARTINI L.
1971, Endocrinol., 88, p.1437

BAULD W.S.
1954, Biochem. J., 56, 426

BEATSON G.T.
1896, Lancet, 2, p.104

BEISER S.M., ERLANGER B., AGATE F., LIEBERMAN S.
1959; Science 129, p. 564

BERNSTEIN S., LENHARD R.H.
1953, J. Org. Chem., 18, 1146

BERSON S.A., YALOW R.S.
1959(1) Nature (London) 184, p. 1648

BERSON S.A., YALOW R.S.
1959(2) J. Clin. Invest., 38, p. 1996

BERSON S.A., YALOW R.S.
1964, in "The Hormones", Pincus G., Thimann K.V., ASTWOOD E.B. (eds), vol. IV, Academic Press, N.Y., p. 557

BREUER H.
1965, in "Estrogen Assays in Clin. Medicine", Washington Press.

BOSU W., HOLMDAHL T., JOHANSSON E.D.B., GEMZELL C.
1972, Acta Endocr. 71, 4

BROWN J.B.
1952 J. Endocr., 8, 196

BROWN J.B.
1955, Biochem. J., 60, 185

BROWN J.B.
1956, Lancet 1, 704

BROWN-GRANT K., EXLEY D., NAFTOLIN F.
1970, J. Endocr., 48, p. 295

CEDARD L.
1965, Thèse Doctorat ès-Sciences, Paris

CEDARD L.
1967, in "Fonctions endocriniennes de l'ovaire", Gauthier-Villars, Paris, p. 389

CHALLIS J.R.G., HEAP R.B., ILLINGWORTH D.V.
1971, J. Endocr. 51, p. 333

CHANNING C.P.
1970, Rec. Progr. in Hormones Res. 26, p. 589

COHEN J., AUDEBERT A.
1973, "Le Corps jaune", Masson, Paris, p. 461

CORKER C.S., EXLEY D., NAFTOLIN F.
1970 in "Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology", vol. II

COST W.S.
1964, Acta Endocrinol., 42, 61

COYLE M.G., MITCHELL F.L., RUSSEL C.S.
1956, J. Obstet. Gynaecol. Brit. Empire, 63, 560

DAUGHADAY W.H.
1958, J. Clin. Invest. 37, 511

DEAN P.D.G., EXLEY D., JOHNSON M.W.
1971, Steroids, 18, 5, p. 593

DEANESLY R.
1960, J. Endocr. 21, p. 235

DESFOSSES B., de LAUZON S., JUDAS O. JAYLE M.F.
1973, Lipids and Steroids, sous presse.

DICZFALUSY E., BENAGIANO G.
1966, in "IInd Meeting of the International Group for Steroid Hormones". Res. Steroids, 2, p. 27

DICZFALUSY E., PALMER R.F.
1967, in "Les Fonctions endocriniennes du corps jaune" Masson, Paris, p. 401

DOERR P.
1973, Acta Endocrinol., 72, p. 330

DONINI S., d'ALESSIO I., DONINI P.
1968, in "Gonadotropins", Rosenberd E. (Ed.) Las Altas, California, Geron-X. Inc. p. 263

DRAY F., TERQUI M., DESFOSSES B., CHAUFFOURNIER J.M., MOWSKOWICZ I., KAHN D., ROMBAUTS P., JAYLE M.F.
1971, C.R. Acad. Sc. Paris, 273, p. 2380

DUGGAN D.E., BOWMANN R.L., BRODIE B.B., UDENFRIED S.
1957, Arch. Biochem. Biophys., 68, 1.

EDQVIST L.E., JOHANSSON E.D.B.
1972, Acta Endocr., 71, 4.

ERLANGER B.F., BOREK F., BEISER S.M., LIEBERMAN S.
1957, J. biol. Chem., 228, 713.

ETO T., MASUDA H., SUZUKI Y., HOSI T.
1962, Jap. J. Anim. Reprod., 8, p. 34

EXLEY D.
1969, Acta Endocrinol., Suppl. 138, 18

EXLEY D., JOHNSON M.W., DEAN P.D.G.
1971(1) Steroids, 18, 5, p. 605

EXLEY D., JOHNSON M.W.
1971(2) J. Physiol., 219, p. 21

EXLEY D.
1972, J. Steroid. Biochem.,3

FEDER H., RESKO J.A., GAY R.W.
1968, J. Endocr., 40, p. 505

FERIN M., ZIMMERING P.E., LIEBERMAN S., VAN DE WIELE R.L.
1968, Endocrinology, 83, p. 565

FINKELSTEIN M.
1952, Acta Endocr., 10, p. 149

FRANK R.T., GOLDBERGER M.A.
1926, J. Amer. Med. Assoc., 87, 1719

FRIEDGOOD H.B., GARST J.B.
1948, in "Rec. Progr. in Hormones Research", Academic Press, N.Y., 2, p. 31

FURUYAMA S., NUGENT C.A.
1971, Steroids, 17, p. 663

FUTTERWEIT W., MAC NIVEN N.L., DORFMAN R.I.
1963, Biochim. Biophys. Acta, 71, 474

GIVNER M.L., BAULD W.J., VAGI K.
1960, Biochem. J., 77, 406

GOLDZIEHER J.V.
1953, Endocrinology, 53, p. 527

GOODFRIEND L., SEHON A.H.
1958, Canad. J. Biochem. Physiol. 36, p.1177

GOODFRIEND L.,SEHON A.H.
1960, Nature (London), 185, p. 764

GOODFRIEND L., SEHON A.H.
1961(a) Canad. J. Biochem, Physiol., 39, p. 941

GOODFRIEND L., SEHON A.H.
1961(b) Canad. J. Biochem. Physiol., 39, p. 961

GOODFRIEND L., SEHON A.H.
1970, in "Immunologic Methods in Steroid Determination" Peron F.G., Caldwell B.V. (Eds), N.Y., Appleton Century Crofts

GREEN J.A.
1955, Endocrinology, 56, p. 621

GROSS S.J., CAMPBELL D.H., WEETHALL H.H.
1968, Immunochemistry, 5, 55, p. 65

GROSS S.J.
1970, in "Immunologic Methods in Steroid Determination"
Peron F.G., Caldwell B.V. (Eds), N.Y. Appleton Century Crofts

GROSS S.J., GRANT J.D., BENNETT R., WONG S.L.R., LOMAX P.
1971, Steroids, 18, 5, p. 555

GURPIDE E., GIEBENHAIN M.E., TSENG L., KELLY W.G.
1971, Am. J. Obstet. Gynec., 109, 6, p. 897

HANING R., MAC CRACKEN J., SAINT CYR M., UNDERWOOD R., WILLIAMS G., ABRAHAM G.
1972, Steroids, 20, 1.

HANSON F.W., POWELL J.E., STEVENS V.C.
1971, J. Clin. Endocr., 32, 211

HASHIMOTO J., HENRICKS D.M., ANDERSON L.L., MELAMPY R.M.
1968, Endocrinology, 82, p. 333

HEAP R.B., ILLINGWORTH D.V., PERRY J.S.
1973, in "Le Corps jaune", Masson, Paris

HEARD R.D.H., O'DONNEL V.J.
1954, Endocr., 54, 209

HENDRICK J.C.
1972, Thèse de Doctorat ès-Sciences Biomédicales Expérimentales, Université de Liège, Faculté de Médecine

HIRSHMAN H.
1952, J. Amer. Chem. Soc., 74, p. 5357

KNOBIL E.
1973, in "Le Corps jaune", Masson, Paris.

HOLMDAHL T.H., JOHANSSON E.D.B.
1972, Acta Endocr., 71, 4

HODGEN G.O., DUFAU M.L., CATT K.J., TULLNER W.W.
1972, Endocr., 91, 4

ICHII S., FORCHIELLI E., PERLOFF W.H., DORFMAN R.I.
1963, Anal. Biochem. 5, 422

ILLINGWORTH D.V., DEANESLY R.
1972, J. Endocr. 54, p. 435

ITTRICH G.
1960, Z. Physiol. Chem., 320, 103.

JAILER J.W.
1947, Endocr. 41, 198

JAYLE M.F.
1954, in "Acta del 3° Congresso Panamericano de Endocrinologia, Santiago du Chile", 1953, p. 40

JAYLE M.F., SCHOLLER R., HERON M., METAY S.
$1959_{(a)}$ Clin. Chim. Acta 4, 276

JAYLE M.F., SCHOLLER R., VEYRIN-FORRER F.
$1959_{(b)}$ Clin. Chim. Acta 4, p. 401

JAYLE M.F., DECOURT J., MAUVAIS-JARVIS P., MICHART J.P.
1960, Presse Med., 68, 1923

JAYLE M.F.
$1962_{(a)}$ in "Les Gonadotrophines en Gynecologie", Masson, Paris, p. 167

JAYLE M.F., SCHOLLER R., HERON M., METAY S.
$1962_{(b)}$ in "Analyse des Steroïdes hormonaux", Tome II, Masson, Paris, p. 370

JAYLE M.F.
1963, in "Exploration dynamique de la fonction lutéale", 7ème Réunion des Endocrinologistes de Langue française, Beyrouth, Masson, Paris.

JAYLE M.F.
1965, in "Hormonologie de la grossesse humaine", Gauthiers-Villars, Paris

JAYLE M.F., GELLER S., SCHOLLER R.
1967, Semaine des Hopitaux, 53, 8, p. 3398

JAYLE M.F.
1968, in "Les Gonadotrophines d'origine humaine", Table Ronde, Maison de la Chimie, Paris, p. 25.

JAYLE M.F., PALMER R.
$1973_{(a)}$ Int. J. Fertil., 18, p. 33

JAYLE M.F., PALMER R., KAMOUN H., MATUCHANSKY C.
$1973_{(b)}$ in "Le Corps jaune", Masson, Paris.

JEFFCOATE S.L., SEARLE J.E.
1971, Acta Endocr., Suppl. 155, 100

JEFFCOATE S.L., SEARLE J.E.
1972, Steroids, 19, 2

JEWELEWICZ R., DYRENFURTH I., WARREN M., SOSHI U., VAN DE WIELE R.L.
1973, in "Le Corps jaune", Masson, Paris, p. 353

JIANG N.S., RYAN R.J.
1969, Mayo Clin. Proc. 44, p. 461

JOHANSSON E.D.B.
1969, Acta Endocr., 61, p. 592

JONES R.N., HERLING F.
1956, J. Am. Chem. Soc., 78,1152

JONES H.A., HAHNEL R.
1969, Steroids, 13, 5

KNOX B.S., FRANCE J.T.
1972, Clin. Chem., 18, 3, p. 212

KORENMAN S.G., TULCHINSKY D., EATON L.W.
1970, in "Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology"

KROMAN H.S., BENDER S.R., CAPIZZI R.L.
1964, Clin. Chim. Acta, 9, 73

de LAUZON S.
1970, Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 2

de LAUZON S., DESFOSSES B., ROMBAUTS P., DRAY F., UHRICH F., JAYLE M.F.
1972, C.R. Acad. Sc. Paris, 274, p. 3023

de LAUZON S., CITTANOVA N., DESFOSSES B., JAYLE M.F.
$1973_{(1)}$ - Steroids, à paraitre en décembre

de LAUZON S., PLANTUREUX G., JUDAS O., UHRICH F., DUTTER F., PLOUCHART A., CITTANOVA N., JAYLE M.F.
$1973_{(2)}$ J. Gyn. Obst. Repr. - sous presse.

LECLERQ R., SUTTER R., SUTTER R.C.J.
1971, Acta Endocr., Suppl. 155

LEMON H.M., WOTIZ H.H., PARSONS L., MOZDEN P.J.
1966, J. Am. Med. Ass. 196, p. 1128

LEHMANN F., BETTENDORF G., NEALE Ch.
1971, Acta Endocr., Suppl. 155, 76

LEHMANN F., BRECKWOLDT M., BETTENDORF G.
1973, in "Le Corps jaune", Masson, Paris, p. 81

LONGWELL B., WINTERSTEINER O.
1940, J. biol. Chem., 133, 219

LIEBERMAN S., ERLANGER B.F., BEISER S.M., AGATE F.J.
1959, in "Rec. Progr. Hormones Research", 15, p. 165

LINDNER H.R., PEREL E., FRIEDLANDER A.
1970, in "Research in Steroids", Finkelstein M., Conti C., Klopper A., Cassano C. (Eds), Pergamon Press,Oxford-N.Y.p.197

LINDNER H.R., PEREL E., FRIEDLANDER A., ZEITLIN A.
1972, Steroids, 19, 3, p. 357

LLOYD C.W., LOBOTZKY I., BAIRD D.T., MAC CRACKEN J.A., WEISZ J.
1971, J. Clin. Endocr., 32, 155

LONGCHAMPT J., 1958, Thèse de Doctorat en Médecine

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., ANDALL R.J.
1951, J. biol. Chem. 193, p. 265

LUNENFELD B., DONINI P.
1973, in "Le Traitement de l'anovulation par les Hormones gonadotropes humaines, Masson, Paris, p. 335

MARLOW H.W.
1950, Biochem. J., 183, p. 167

MARMORSTON J., CROWLEY L.G., MYERS S.M., STERN E., HOPKINS C.E.
1965, Am. J. Obst. Gynec., 92, 4, p. 447

MARRIAN G.F.
1929, Biochem. J., 23, 1090

MARRIAN G.F., BAULD W.S.
1955, Biochem. J., 59, 136

MARRIAN G.F., SNEDDON A.
1960, Biochem. J., 74, 430

MARTIN E.A.
1963, Rev. Can. Biol., 22, 43

MARTIN B.T., COOKE B.A., BLACK W.P.
1970, J. Endocr., 46, 369

MESTER J., ROBERTSON D.M., KELLIE A.E.
1971, J. Steroid. Biochem., 2, 1.

MIDGLEY A.R., NISWENDER G.D., RAM J.S.
1969, Steroids, 13, 731

MIKHAIL G., WU C.H., FERIN M., VAN DE WIELE R.L.
1970(1) Steroids, 15, p. 333

MIKHAIL G., FERIN M., VAN DE WIELE R.L.
1970(2) in "Immunologic Methods in Steroid Determination"
Peron F.G., Caldwell B.V. (Eds), N.Y. Appleton Century Crofts

MOORE P.H., AXELROD L.R.
1972, Steroids, 20, 2, p. 199

MORISHIGE W.K., PEPE G.J., ROTCHILD I.
1973, Endocr., 92, 1527

MULLER P.
1962, in "Les Gonadotrophines en Gynecologie" Clermont-Ferrand,
Masson, p. 137

NAKAO T., AIZAWA Y.
1956, Endocrinol. Japan, 3, 92.

NIMROD A., LADANY S., LINDNER H.R.
1972, J. Endocr., 53, p. 249

NISSEN-MEYER R., SANNER T.
1963, Acta Endocr., 44, p. 334

NISWENDER G.D., REICHERT L.E., MIDGLEY A.R., NALBANDOV A.V.
1969, Endocrinology, 84 p. 1166

NISWENDER G.D., MIDGLEY A.R.
1970, in "Immunologic Methods in Steroid Determination"
Peron F.G., Caldwell B.V. (Eds), N.Y., Appleton Century Crofts

NOCKE W.
1961, Biochem. J., 78, 593

NUNEZ E., SAVU L., ENGELMANN F., BENASSAYAG C., CREPY O.,JAYLE M.F.
1971, C.R. Acad. Sc. Paris, 273, p. 242

OERTEL G.W.
1961, Klin. Wschr., 39, 492

PALMER R., KLEIN R.
1970, C.R. Soc: Fr. Gynecol., 40, 597

PANICUCCI F., TAPONECO G.
1965, Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 41, 1459

PEARLMAN W.H., CREPY O.
1967, J. biol. Chem., 242, 2, p. 182

PICHON M.F., MILGROM E.
1973, Steroids, 21, 3, 335

PREEDY R.R.K.
1957, Lancet, p. 191

PRESL J., HORSKY J., HERZMANN J., MIKULAS I., HENZL M.
1967, J. Endocr., 38, p. 201

PRESSMANN D., GROSSBERG A.L.
1968, in "The structural Basis of Antibody Specificity", W.A.Benjamin, N.Y. p. 249

PRESSMANN D., ROHOLT O.A., GROSSBERG A.L.
$1970_{(a)}$ Ann. N.Y. Acad. Sci. 169, 1, p. 65

PRESSMANN D., GROSSBERG A.L.
$1970_{(b)}$ in "Immunologic Methods of Steroid Determination" Peron F.G., Caldwell B.V. (Eds) N.Y., Appleton Century Crofts,p.1

REYNOLDS S.M.R., GINSBURG N.
1942, Endocrinology, 31, p. 147

RICE B.F., HAMMERSTEIN J., SAVARD K.
1964, J. Clin. Endocr., 24, 606

RIONDEL A., TAIT J.F., TAIT S.A.S., GUT M., LITTLE B.
1967, J. Clin. Endocr., 27, 1167

RODBARD D., RUDER M.J., VAITUKAITIS J., JACOBS H.S.
1971, J. Clin. Endocr., 33, p, 343

RODBARD D., CATT K.J.
1972, J. Steroid. Biochem., 3

ROSENTHAL H.E.
1967, Anal. Biochem., 20, 525

ROSER S., BLOCH R.B.
1969, C.R. Acad. Sci. Paris, 268, p. 1318

ROSS G.T., CARGILLE C., LIPSETT M.B., RAYFORD P.L., MARSHALL J.R., STROTT C.A., RODBARD D.
1970, Rec. Progr. in Hormones Research, 26, 1.

ROY E.J.
1962, J. Endocr., 25, p. 361

RYAN K.I., PETRO Z.
1966, J. Clin. Endocr., 26, p. 46

SAEZ J.M., MORERA A.M., DAZORD A., BERTRAND J.
1972, J. Endocr., 55, p. 41

SAVU L., CREPY O., GUERIN M.A., NUNEZ E., ENGELMANN F., BENASSAYAG C., JAYLE M.F.
1972, FEBS Letters, 22, 1.

SAVU L., de LAUZON S., ROMBAUTS P., JAYLE M.F.
1973, FEBS Letters, 36, 1, p. 113

SCATCHARD G.
1949, Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660

SCHOLLER R., LONGCHAMPT J., JAYLE M.F.
1960, Bull. Soc. Chim. France, 189

SCHOLLER R., LEYMARIE P., HERON M., JAYLE M.F.
1966, Acta Endocr., Suppl. 107, 52

SCHOLLER R., TEA N.T., CASTANIER M.
1973, in "Le Corps jaune", Masson Ed., p. 95

SCHWERS J.
1964, Thèse Univ. libre, Bruxelles

SHAIKH A.A., ABRAHAM G.E.
1969, Biol. Reprod., 1, 4, p. 378

SHAIKH A.A.
1971, Biol. Reprod., 5, 3, p. 297

SHEARMAN R.P.
1959, J. Obst. Gynecol. Brit. Empire, 66, 1

SHORT R.V.
1968, in "La Physiologie de la Reproduction chez les mammifères", Coll. Intern. CNRS, Nov. 1966, CNRS Ed., Paris, p.258

SHUTT D.A.
1969, Steroids, 13, 69

SLAWWHITE W.J.R., ENGEL L.L., SCOTT J.F., HEM. C.L.
1953, J. biol. Chem. 201, 615

SMITH O.W., ARAI K.
1963, J. Clin. Endocr. Metab., 23, 1141

SOMMERVILLE I.F.
1966, Bioch. Biol. Sperim., 5, 2

SPRUNT D.H., DULANEY A.D., CONGER R.
1951, Cancer Res., 11, 282

STÁSTNÝ J. DUBEY L.
1970, Z. Anal. Chem., 252, p. 309

STÁSTNÝ J. DUBEY L.
1971, Acta Endocr., Suppl. 155

STÁSTNÝ J., DUBEY L.
1972, in "EPH Gestosis, Diagnose and Results", Rippman E.T., Rippert Ch. (Eds), de Gruyster, N.Y., Berlin, p. 250

STROTT Ch. A., CARGILLE Ch.M., ROSS G.T., LIPSETT M.B.
1970, J. Clin. Endocr., 30, 246

SVENDSEN R., SORENSEN B.
1964, Acta Endocrinol., 47, 245

TAMAOKI H., MURASE Y., MINATO S., NAKANISHI K.
1967, J. Biochem., 62, 1.

THORNEYCROFT I.H., CALDWELL B.V., ABRAHAM G.E., TILLSON S.A., SCARAMUZZI R.J.
1970, in "Research on Steroids", Finkelstein et al. Eds., vol. IV, Pergamon Press, p. 205

TILLSON S.A., THORNEYCROFT I.H., ABRAHAM G.E., CALDWELL B.V.
1970, in "Immunological Methods in Steroid Determination" Peron F.G. and Caldwell B.V., Eds. N.Y. Appleton Century Crofts

TOUCHSTONE J.C., MURAWEC T.
1965, Biochem., 4, 8

TSYRLINA E., CHEMAMA R., ENNUYER A., JAYLE M.F.
1970, Path. Biol., 18, 669

TULCHINSKY D., ABRAHAM G.E.
1971, J. Clin. Endocr. Metab., 33, 5, 775

TULCHINSKY D., CALVIN J.H., YEAGER E., MARSHALL J.R.
1972, Am. J. Obst. Gyn., 112, 8, p. 1095

UMBERGER E.J., CURTIS J.M.
1949, J. biol. Chem., 178, 275

VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T.
1971, J. Clin. Endocr., 33, p. 988

VAN DER MOLEN H.J.
1963, Clin. Chim. Acta, 8, 943

VAN DER MOLEN H.J., GROEN D.
1965, J. Clin. Endocr., 25, 1625

VAN DER MOLEN H.J., CORPECHOT C.
1968, J. Clin. Endocr., 28, 1361

VAN DE WIELE R., BOGUMIL J., DYRENFURTH I., FERIN M., JEWELEWICZ R., WARREN M., RIZKALLAH T., MIKHAIL G.,
$1970_{(1)}$ Rec. Progr. in Hormones Research, 60, p. 63

VAN DE WIELE R., FERIN M., RAZIANO J., DYRENFURTH I., MIKHAIL G.
$1970_{(2)}$ in "Research on Steroids", Finkelstein M., Conti C., Klopper A., Cassano C. Eds, vol. IV, Pergamon Press, p. 171

VENNING E.H.
1938, J. biol. Chem., 126, 595

WAGNER H., HRUBESCH M., BÖKEL K., ROLFS H.C., JUNGE-HULSING G., HAUSS W.H.
1971, Acta Endocr., Suppl. 155

WAYNFORTH H., POPE G.S., HOSKING Z.O.
$1972_{(1)}$, J. Reprod. Fert., 28, p. 191

WAYNFORTH H., ROBERTSON D.M.
$1972_{(2)}$, J. Endocr., 54, p. 79

WESTPHAL U.
1961, in "Mechanism of Action of Steroid Hormones"
C.A. Villee, Engel L.L., Eds, Pergamon Press, N.Y., p. 33

WILSON G.R.
1972, J. Endocr., 54, 3

WOTIZ H.H., CHARRANSOL G., SMITH I.N.
1967, Steroids, 10, 127

WU Ch. H., LUNDY L.E.
1971, Steroids, 18, 1, p. 91

WU Ch. H., LUNDY L.E., LEE S.G.
1973, Am. J. Obst. Gynecol., 115, 2, p. 169

WYMAN H., SOMMERVILLE I.F.
1968, Steroids, 12, p. 63

YALOW R.S., BERSON S.A.
1968, In "Radioisotopes in Medicine : in vitro studies"
Hayes R.L., Goswitz F.A., Murphy B.E.P., Eds.
US. Atomic Energy Commission, Oak Ridge, Tenn., p. 7

YOSHIMI T., LIPSETT M.B.
1968, Steroids, 11, 527

YOSHIMI T., STROTT C.A., MARSHALL J.R., LIPSETT M.B.
1969, J. Clin. Endocr., 29; 225

YOSHINAGA K., HAWKINS R.A., STOCKER J.F.
1969, Endocr., 85, 1, p. 103

YOUNGLAI E.V., SHORT R.V.
1970, J. Endocr., 47, p. 321

YOUSSEFNEJADIAN E., FLORENSA E., COLLINS W.P., SOMMERVILLE I.F.
1972, J. Steroid Biochem., 3, p. 893

ZIMMERING P.E., LIEBERMAN S., ERLANGER B.F.
1967, Biochem., 6, p. 154

LISTE DES ABREVIATIONS

La nomenclature des stéroïdes et les noms vulgaires sont indiqués dans les tableaux XXVII et XXVIII.

D.O	=	Densité Optique
λ	=	Longueur d'onde
nm	=	Nanomètre
ng	=	Nanogramme
pg	=	Picogramme
CPG	=	Chromatographie en Phase Gazeuse
RMN	=	Résonance Magnétique Nucléaire
BSA	=	Bovine Serum Albumin
HSA	=	Human Serum Albumin
RSA	=	Rabbit Serum Albumin
CMO	=	O-(carboxymethyl)oxime
MHz	=	Megahertz
ε	=	Coefficient d'extinction molaire
PM	=	Poids Moléculaire
TMSi	=	Trimethylsilyl
Pr	=	Protéine
MNT	=	Methoxynitrotropone
cpm	=	coup par minute
SD	=	Déviation standard
Ac	=	Anticorps
Ag	=	Antigène
RC	=	Réaction Croisée
DHS	=	Dihemisuccinate
TS	=	Trisuccinate

E_1	=	Estrone
E_2	=	Estradiol
E_3	=	Estriol
HCG	=	Human Chorionic Gonadotrophin
HMG	=	Human Menopausal Gonadotrophin
PMSG	=	Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
FSH	=	Folliculo-stimulating Hormone
DXM	=	Dexaméthasone
U I	=	Unités Internationales.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES STEROIDES PHENOLIQUES PAR SPECTROPHOTOMETRIE ET FLUOROMETRIE

Introduction

Chapitre I : Etude Spectrophotometrique

A - Matériel 5
B - Méthodes 5
C - Définitions 5
D - Résultats 9
E - Discussion 22

Chapitre II : Détermination des estrogènes plasmatiques totaux par fluorométrie

A - Matériel et Méthodes 34
B - Critères de confiance de la méthode 40
C - Résultats 42

CONCLUSION 49

DEUXIEME PARTIE

ETUDE RADIOIMMUNOLOGIQUE

Introduction 50

Chapitre I : : Préparation d'un immunsérum anti-estriol

A - Matériel 56
B - Synthèse de l'antigène 58
C - Processus d'immunisation 70

Chapitre II : Techniques d'extraction, de purification et de dosage des stéroïdes dans les milieux biologiques.

A - Matériel 72
B - Techniques de dosage des estrogènes totaux et du pregnandiol urinaire 75
C - Technique de dosage de la progestérone urinaire et plasmatique 78
D - Techniques de dosage des estrogènes libres plasmatiques et urinaires. 82

Chapitre III : Immunsérums anti-estrogènes

A - Activité des Immunsérums 103
B - Affinité et sensibilité des Immunsérums 108
C - Spécificité des immunsérums 119
Conclusion 142

TROISIEME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FONCTIONS OVARIENNE ET PLACENTAIRE CHEZ LES MAMMIFERES

INTRODUCTION 143

Chapitre I : Stéroides hormonaux dans les liquides biologiques au cours du cycle et de la grossesse de la femme.

A - Cycle menstruel 145
B - Stimulation folliculaire par HMG 157
C - Stimulation du corps jaune ovarien 163
D - Steroides hormonaux plasmatiques et urinaires au cours de la grossesse humaine 181

Chapitre II : Stéroides hormonaux plasmatiques chez la ratte et chez le cobaye.

Introduction 199
A - Matériel et Méthodes 200
B - Analyse des stéroïdes hormonaux chez la ratte 202
C - Stéroides hormonaux chez le cobaye au cours de la gestation 217
D - Corps jaune pseudo-gestatif chez le cercopithèque. 221

RESUME 224
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 229
LISTE DES ABREVIATIONS 243
TABLE DES MATIERES 245

ACADEMIE DE PARIS

UNIVERSITÉ DE PARIS VI

Place Jussieu - 75230 PARIS-CEDEX 05

SERVICE DE LA SCOLARITE

Bureau des Enseignements du 3e cycle

TÉLÉPHONE . 336-25-25 - 325-12-21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : ES SCIENCES

THESE DE : SCIENCES NATURELLES

NOM : Madame DESFOSSES Epouse DE LAUZON

Prénoms : Solange

né le 9 Juin 19.39 à Saint-Avold Dépt : Moselle

1ère THESE : "Contribution à l'étude des fonctions ovarienne et placentaire chez les mammifères à l'aide de microméthodes d'analyse spécifique.

2e THESE (Propositions faites par l'Université) :

PRESIDENT.M.SOULAIRAC

EXAMINATEURS.MM.OZON

JAYLE

Vu et Approuvé

PARIS, le 9 Janvier 1974

Le Président

de l'Université de PARIS VI

PERMIS D'IMPRIMER